

**Charakterisierung des Aktivierungsmechanismus
der HtrA-Protease DegP von *E. coli***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie und Geografie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Nicolette Mamant

aus Essen

Gutachter: Prof. Dr. M. Ehrmann, Prof. Dr. B. Siebers, Prof. Dr. H. de Groot

Datum der mündlichen Prüfung: 17.12.2009

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Veröffentlichungen enthalten:

Hauske, P., Mamant, N., Hasenbein, S., Nickel, S., Ottmann, C., Clausen, T., Ehrmann, M. und Kaiser, M. (2009) Peptidic small molecule activators of the stress sensor DegS.
Mol. BioSyst., 5(9): 980-985.

Meltzer, M., Hasenbein, S., Mamant, N., Merdanovic, M., Poepsel, S., Hauske, P., Kaiser, M., Huber, R., Krojer, T., Clausen, T. und Ehrmann, M. (2009) Structure, function and regulation of the conserved serine proteases DegP and DegS of *E. coli*.
Res. Microbiol., 2009.

Meltzer, M., Hasenbein, S., Hauske, P., Kucz, N., Merdanovic, M., Grau, S., Beil, A., Jones, D., Krojer, T., Clausen, T., Ehrmann, M. und Kaiser, M. (2008) Allosteric activation of HtrA protease DegP by stress signals during bacterial protein quality control.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 47: 1332-1334;
Angew. Chem., 120: 1352-1355.

Kucz, N., Meltzer, M. und Ehrmann, M. (2006) Periplasmic proteases and protease inhibitors.
The Periplasm, ASM Press, ed. M. Ehrmann: 150-170.

In Vorbereitung:

Merdanovic, M., Meltzer, M., Mamant, N., Pöpsel, S., Beil, A., Soerensen, R., Hauske, P., Kaiser, M., Nagel-Steger, L., Sickmann, A., Huber, R., Clausen, T. und Ehrmann, M.
Determinants of structural and functional plasticity of a widely conserved protease chaperone machine.

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
TABELLENVERZEICHNIS	9
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	10
1 ZUSAMMENFASSUNG	12
2 EINLEITUNG	14
2.1 <i>Escherichia coli</i>	14
2.1.1 <i>E. coli</i> als Modellorganismus	14
2.1.2 Die Morphologie von <i>E. coli</i>	14
2.2 Proteinqualitätskontrolle.....	17
2.2.1 Chaperone.....	17
2.2.2 Proteasen	19
2.3 Serinproteasen	20
2.4 HtrA-Proteasen.....	22
2.5 Die periplasmische Serinprotease DegP	25
2.5.1 Die Regulation der <i>degP</i> -Expression in der Zelle.....	25
2.5.2 Die Struktur von DegP	28
2.5.3 Die Doppelfunktion von DegP als Protease und Chaperon	31
2.6 PDZ-Domänen	33
2.6.1 Die Rolle von PDZ-Domänen in HtrA-Proteasen.....	37
2.6.2 Die PDZ-Domänen von DegP	40
2.7 Die allosterische Aktivierung der HtrA-Protease DegS.....	42
2.8 Zielsetzung der Arbeit.....	45
3 MATERIAL UND METHODEN	46
3.1 Allgemeines	46
3.2 Bakterienstämme	46
3.3 Vektoren und Plasmide.....	46
3.4 Oligonukleotide.....	48
3.5 Antiseren	49
3.6 Proteine und Enzyme	49
3.7 Peptide	51
3.8 DNA- und Proteinstandards.....	51
3.9 Reaktions- und Nachweis-Kits	52
3.10 Chemikalien	52
3.11 Geräte	52
3.12 Diverses.....	53
3.13 Mikrobiologische Methoden.....	54

3.13.1	Sterilisation.....	54
3.13.2	Bakterienanzucht.....	54
3.13.2.1	Herstellung von Nährmedien	54
3.13.2.2	Antibiotika.....	54
3.13.2.3	Andere Medienzusätze	55
3.13.2.4	Anzucht von <i>E. coli</i>	55
3.13.2.5	Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	55
3.14	Molekularbiologische Methoden.....	55
3.14.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	55
3.14.2	Methoden zur Charakterisierung von DNA	55
3.14.2.1	Restriktionshydrolysen von Plasmid-DNA	55
3.14.2.2	Agarosegelelektrophorese	56
3.14.2.3	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	56
3.14.2.4	Sequenzierung	56
3.14.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	57
3.14.4	Ligierung von DNA-Fragmenten	57
3.14.5	Transformation	57
3.14.5.1	Herstellung elektrokompeter Zellen	57
3.14.5.2	Elektrotransformation.....	58
3.14.5.3	Herstellung transformationskompetenter Zellen für die Transformation durch Hitzeschock	58
3.14.5.4	Transformation der kompetenten Bakterienzellen mit Plasmid-DNA mittels Hitzeschock.....	59
3.14.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	59
3.14.6.1	Kolonie-PCR	60
3.14.6.2	Oligomutagenese	61
3.14.7	Aufreinigung von PCR-Produkten	62
3.14.8	Plasmidkonstruktionen	62
3.14.8.1	Konstruktion der Plasmide pNK11, pNK12, pNK13 und pNK14.....	62
3.14.8.2	Konstruktion der Plasmide zur Expression der DegP-Punktmutanten.....	63
3.15	Biochemische Methoden	63
3.15.1	Gesamtproteinisolierung aus <i>E. coli</i>	63
3.15.2	Acetonfällung von Proteinen.....	63
3.15.3	Proteinreinigung	64
3.15.4	Proteinkonzentrationsbestimmung	65
3.15.5	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	65
3.15.6	Tris-Tricin Gelelektrophorese	66
3.15.7	Coomassie-Färbung.....	67
3.15.8	Silberfärbung	68
3.15.9	Western Immunoblotanalyse.....	69
3.15.10	Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von DegP und DegP-Derivaten	70
3.15.10.1	Gelfiltration	70
3.15.10.2	Cross-Link Methode.....	71
3.15.11	Nano-HPLC mit MS-Kopplung (Nano-LC-MS/MS)	72
3.15.12	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von DegP und DegP-Derivaten	73
3.15.12.1	Spaltung von pNA-Peptiden.....	73
3.15.12.2	Abbau von β -Casein	74
3.15.12.3	Zymogramm	74
3.15.13	Komplementation der Hitzesensitivität eines degP ⁻ -Stammes durch DegP und DegP-Derivate	75

3.15.14	Herstellung und Inkubation von Peptidbibliotheken.....	75
3.15.15	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC).....	76
4	ERGEBNISSE	77
4.1	Die allosterischen Aktivierung der Protease DegP aus <i>E. coli</i>	77
4.1.1	Reinigung von DegP und DegP _{S210A}	77
4.1.2	Die allosterische Aktivierung von DegP im pNA-Enzymtest.....	78
4.1.3	Validierung der Bindung von Aktivatoren an DegP mittels ITC.....	80
4.1.4	Die Oligomerisierung von DegP	83
4.1.4.1	Der Effekt von Aktivatoren auf den oligomeren Zustand von DegP	83
4.1.4.2	Der Effekt der Temperatur auf den oligomeren Zustand von DegP	85
4.1.5	Identifizierung neuer DegP-Aktivatoren	87
4.1.5.1	Screening einer DegP-Peptidbibliothek	87
4.1.5.2	Aktivierung von DegP durch neu identifizierte Peptide	89
4.1.5.3	Validierung der Bindung der neu identifizierten an DegP bindenden Peptide mittels ITC	90
4.1.5.4	Der Einfluss der neu identifizierten Aktivatoren auf den oligomeren Zustand von DegP	91
4.2	Charakterisierung der PDZ-Domänen von DegP	92
4.2.1	Analyse der PDZ-Domänen von DegP	92
4.2.1.1	Reinigung der PDZ-Domänen von DegP und von DegS.....	93
4.2.1.2	Validierung der Bindung von Liganden an die PDZ-Domänen von DegP und DegS mittels ITC	94
4.2.1.3	Oligomerisierung der PDZ-Domänen von DegP und DegS	95
4.2.1.4	Komplementieren einzelne PDZ-Domänen DegP-Deletionsmutanten in ihrer proteolytischen Aktivität?	96
4.2.2	Mutationsanalyse der PDZ-Domänen von DegP	97
4.2.2.1	Reinigung der PDZ-Mutanten von DegP	99
4.2.2.2	<i>In vivo</i> Komplementation eines <i>degP</i> ⁻ - Stammes durch DegP PDZ-Mutanten	99
4.2.2.3	Die proteolytische Aktivität von DegP PDZ-Mutanten	101
4.2.2.3.1	Bestimmung der spezifischen Aktivität von DegP PDZ-Mutanten im pNA-Enzymtest	101
4.2.2.3.2	Die Hydrolyse von Casein im Zymogramm durch DegP PDZ-Mutanten .	103
4.2.2.3.3	Die Hydrolyse von β -Casein durch DegP PDZ-Mutanten	104
4.2.2.3.4	Massenspektrometrische Untersuchung der Hydrolyse von Citratsynthase durch DegP PDZ-Mutanten	105
4.2.2.4	Aktivierung von DegP PDZ-Mutanten im pNA-Enzymtest	108
4.2.2.5	Oligomerisierung von DegP PDZ-Mutanten.....	109
4.2.2.6	Validierung der Bindung von Liganden an DegP PDZ-Mutanten mittels ITC	111
4.3	Mutationsanalyse des Loop 3 von DegP	114
4.3.1	Reinigung der L3-Mutanten von DegP	115
4.3.2	<i>In vivo</i> Komplementation eines <i>degP</i> ⁻ - Stammes durch DegP L3-Mutanten.....	115
4.3.3	Die proteolytische Aktivität von DegP L3-Mutanten	116
4.3.3.1	Bestimmung der spezifischen Aktivität von DegP L3-Mutanten im pNA-Enzymtest	116
4.3.3.2	Die Hydrolyse von Casein im Zymogramm durch DegP L3-Mutanten	118
4.3.3.3	Die Hydrolyse von β -Casein durch DegP L3-Mutanten	118
4.3.4	Aktivierung von DegP L3-Mutanten im pNA-Assay	119

4.3.5	Oligomerisierung von DegP L3-Mutanten.....	121
4.3.6	Validierung der Bindung von Liganden an DegP L3-Mutanten mittels ITC.....	122
4.4	Mutationsanalyse des Loop 2 von DegP	123
4.4.1	Reinigung der L2-Mutanten von DegP	124
4.4.2	<i>In vivo</i> Komplementation eines <i>degP</i> ⁻ Stammes durch DegP L2-Mutanten.....	124
4.4.3	Die proteolytische Aktivität von DegP L2-Mutanten	125
4.4.3.1	Bestimmung der spezifischen Aktivität von DegP L2-Mutanten im pNA-Enzymtest	125
4.4.3.2	Die Hydrolyse von Casein im Zymogramm durch DegP L2-Mutanten	126
4.4.3.3	Die Hydrolyse von β -Casein durch DegP L2-Mutanten	126
4.4.3.4	Massenspektrometrische Untersuchung der Hydrolyse von Citratsynthase durch DegP L2-Mutanten	127
4.4.4	Aktivierung von DegP L2-Mutanten im pNA-Assay	129
4.4.5	Oligomerisierung von DegP L2-Mutanten.....	130
4.4.6	Validierung der Bindung von Liganden an DegP L2-Mutanten mittels ITC.....	131
5	DISKUSSION	132
5.1	Neue Einblicke in den Mechanismus der DegP-Aktivierung und Oligomerisierung	132
5.1.1	Die Stärke der DegP-Aktivierung korreliert mit der Stärke der Bindung des Aktivators an DegP.....	133
5.1.2	Der Mechanismus der Oligomerisierung von DegP	135
5.2	Die Bindeeigenschaften von DegP	137
5.2.1	Die Sequenzspezifität der PDZ1-Domäne	137
5.2.2	Die Sequenzspezifität des aktiven Zentrums	137
5.2.3	Das Aktive Zentrum und die PDZ1-Domäne von DegP besitzen eine ähnliche Sequenzspezifität	138
5.3	Identifizierung neuer DegP-Aktivatoren.....	139
5.4	Die Rolle verschiedener DegP-Bereiche für die Aktivierung und Oligomerisierung	141
5.4.1	Die PDZ1-Domäne ist von zentraler Bedeutung für die Funktion von DegP.....	141
5.4.2	Die Rolle des Loop L3 für die Funktion von DegP	142
5.4.3	Die Rolle des Loop L2 für die Funktion von DegP	144
5.5	Allosterische Aktivierung und Oligomerisierung von DegP-Ein mechanistisches Modell.....	145
5.6	Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Regulation von DegP und DegS.....	147
5.7	Ausblick.....	148
6	LITERATUR	151
7	ANHANG	166
	DANKSAGUNG	167
	LEBENS LAUF	168
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	169
	ANGABEN ZUR PRÜFUNG	170

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Schematische Darstellung von <i>E. coli</i> (Nelson und Cox, 2000, modifiziert)	15
Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Zellwand des Gram negativen Bakteriums <i>E. coli</i> ..	16
Abb. 2-3: Hydrolyse einer Peptidbindung durch eine Serinprotease	21
Abb. 2-4: Aufbau der HtrA-Proteasen (Clausen <i>et al.</i> , 2002).....	22
Abb. 2-5: Trimere Struktur von DegS (Wilken <i>et al.</i> , 2004, modifiziert)	24
Abb. 2-6: σ^E -Signaltransduktionskaskade (Chaba <i>et al.</i> , 2007, modifiziert)	26
Abb. 2-7: Signaltransduktion über das CpxA/CpxR Zweikomponentensystem.....	27
Abb. 2-8: Monomere und trimere Struktur von DegP	28
Abb. 2-9: Hexamere Struktur von DegP (Krojer <i>et al.</i> , 2002)	29
Abb. 2-10: Struktur des DegP 24mer (Krojer <i>et al.</i> , 2008a)	30
Abb. 2-11: Prozessive Hydrolyse von Substraten durch DegP (Krojer <i>et al.</i> , 2008b, modifiziert)	32
Abb. 2-12: Struktur der PDZ3 von PSD-95 und Peptidbindung.....	35
Abb. 2-13: Die Bindung interner Peptidmotive an PDZ-Domänen (Harris und Lim, 2001)...	36
Abb. 2-14: Klassifizierung der PDZ-Proteine nach Struktur und Funktion.....	37
Abb. 2-15: Kristallstruktur von HtrA2-PDZ (Zhang <i>et al.</i> , 2007)	38
Abb. 2-16: Peptidbindung an die PDZ-Domäne von DegS (Wilken <i>et al.</i> , 2004).....	39
Abb. 2-17: Struktur von HtrA1-PDZ (Runyon <i>et al.</i> , 2007)	40
Abb. 2-18: Strukturen der PDZ-Domänen von DegP (Iwanczyk <i>et al.</i> , 2007)	41
Abb. 2-19: Die allosterische Aktivierung von DegS.....	43
Abb. 2-20: Übergang vom inaktiven zum aktiven DegS (Hasselblatt <i>et al.</i> , 2007, modifiziert).....	44
Abb. 4-1: Reinigung des Proteins DegP _{S210A}	78
Abb. 4-2: Aktivierung von DegP im Enzymtest mit SPMFKGV-pNA als Substrat	79
Abb. 4-3: ITC mit DegP _{S210A}	81
Abb. 4-4: Cross-Links von DegP _{S210A} mit verschiedenen Aktivatoren	85
Abb. 4-5: Der Effekt der Temperatur auf den oligomeren Zustand von DegP _{S210A}	86
Abb. 4-6: Screening der <i>E. coli</i> Peptidbibliothek mit DegP ³	88
Abb. 4-7: Expression und Reinigung der PDZ-Domänen von DegP und DegS.....	93
Abb. 4-8: Gelfiltration von DegP-PDZ1+2.....	95
Abb. 4-9: Komplementation der proteolytischen Aktivität im Abbau von β -Casein von DegP _{ΔPDZ2} durch PDZ2	97
Abb. 4-10: Peptidbindetasche der PDZ1-Domäne von DegP (Krojer <i>et al.</i> , 2002).....	98
Abb. 4-11: Reinigung der PDZ-Mutanten von DegP.....	99
Abb. 4-12: <i>In vivo</i> Komplementation der Hitzesensibilität.....	100
Abb. 4-13: Bestimmung der spezifischen Aktivität der DegP PDZ-Mutanten mit dem Substrat SPMFKGV-pNA.....	102
Abb. 4-14: Bestimmung der spezifischen Aktivität der PDZ-Mutanten von DegP mit dem Substrat DPMFKLV-pNA.....	103
Abb. 4-15: Zymogramm von DegP PDZ-Mutanten.....	104
Abb. 4-16: β -Casein Verdau durch DegP PDZ-Mutanten	105

Abb. 4-17: Profil des Komplettverdaus von Citratsynthase durch DegP, DegP _{R262A} und DegP _{V328S}	107
Abb. 4-18: Längen der Fragmente des Komplettverdaus von Citratsynthase durch DegP, DegP _{R262A} und DegP _{V328S}	107
Abb. 4-19: Cross-Link von DegP PDZ-Mutanten in Anwesenheit des Peptids DPMFKLV	111
Abb. 4-20: ITC mit β -Casein und DegP PDZ-Mutanten	113
Abb. 4-21: Reinigungen der Loop3-Mutanten von DegP	115
Abb. 4-22: Bestimmung der spezifischen Aktivität der Loop 3-Mutanten von DegP mit dem Substrat SPMFKGV-pNA.....	117
Abb. 4-23: Bestimmung der spezifischen Aktivität der Loop 3-Mutanten von DegP mit dem Substrat DPMFKLV-pNA	117
Abb. 4-24: Zymogramm von DegP L3-Mutanten.....	118
Abb. 4-25: β -Casein Verdaus durch DegP L3-Mutanten	119
Abb. 4-26: Cross-Link von DegP L3-Mutanten in Anwesenheit des Peptids DPMFKLV ...	121
Abb. 4-27: ITC des Peptids DPMFKLV mit DegP _{Δ189-195} und DegP _{L190A}	123
Abb. 4-28: Bestimmung der spezifischen Aktivität der Loop 2-Mutanten von DegP im pNA-Enzymtest.....	125
Abb. 4-29: Zymogramm von DegP L2-Mutanten.....	126
Abb. 4-30: Profil des Komplettverdaus von Citratsynthase durch DegP, DegP _{I228A} und DegP _{I236A}	128
Abb. 4-31: Längen der Fragmente des Citratsynthase-Komplettverdaus durch DegP, DegP _{I228A} und DegP _{I236A}	128
Abb. 4-32: Cross-Link von DegP L2-Mutanten in Anwesenheit des Peptids DPMFKLV ...	130
Abb. 5-1: Mutationsanalyse der Proteasedomäne von DegP	143
Abb. 5-2: Position der relevanten Domänen von DegP im Hexamer und 24mer	146

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Klassifizierung von PDZ-Domänen anhand der Konsensussequenz des Liganden	36
Tab. 3-1: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	46
Tab. 3-2: Verwendete Vektoren und Plasmide	46
Tab. 3-3: Verwendete Oligonukleotide	48
Tab. 3-4: Verwendete Antiseren	49
Tab. 3-5: Verwendete Enzyme	49
Tab. 3-6: Verwendete Proteine	50
Tab. 3-7: Verwendete Peptide	51
Tab. 3-8: Konstruktion der Plasmide pNK11, pNK12, pNK13 und pNK14	63
Tab. 3-9: Verwendete Antikörper und Versuchsbedingungen	69
Tab. 4-1: Bindungsaffinitäten zwischen putativen Liganden und DegP _{S210A}	82
Tab. 4-2: Bindungsaffinitäten zwischen Liganden und DegP _{S210A} und rückgefaltetem DegP _{S210A}	83
Tab. 4-3: Identifizierte an HtrA-Proteine bindende Peptide	89
Tab. 4-4: Aktivierungsfaktoren putativer Aktivatoren von DegP	90
Tab. 4-5: Dissoziationskonstanten neu identifizierter DegP-bindender Peptide	91
Tab. 4-6: Bindungsaffinitäten zwischen β -Casein sowie DNRDGNVYFF und den PDZ-Domänen von DegP und von DegS	94
Tab. 4-7: Komplementation der Hitzesensibilität durch DegP PDZ-Mutanten	101
Tab. 4-8: Aktivierung der DegP PDZ-Mutanten im pNA-Enzymtest	109
Tab. 4-9: Bindungsaffinitäten zwischen β -Casein und DegP PDZ-Mutanten	112
Tab. 4-10: Bindungsaffinitäten zwischen DNRDGNVYFF oder DPMFKLV und den DegP PDZ-Mutanten	114
Tab. 4-11: Komplementation der Hitzesensibilität durch DegP L3-Mutanten	116
Tab. 4-12: Aktivierung der DegP L3-Mutanten im pNA-Enzymtest	120
Tab. 4-13: Bindungsaffinitäten zwischen dem Peptid DPMFKLV und DegP L3-Mutanten	122
Tab. 4-14: Komplementation der Hitzesensibilität durch die DegP L2-Mutanten	124
Tab. 4-15: Hydrolyse von β -Casein durch DegP L2-Mutanten	127
Tab. 4-16: Aktivierung der DegP L2-Mutanten im pNA-Enzymtest	129
Tab. 4-17: Bindungsaffinitäten zwischen β -Casein und DegP L2-Mutanten	131
Tab. 5-1: DegP-Aktivatoren	140
Tab. 7-1: Inkubation der EcoBib Peptidbibliothek mit DegP	166

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Ampere
A. dest	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A ₄₀₅	Absorption bei 405 nm
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosindriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BLU	Böhringer Light Units
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
cm	Zentimeter
CMK	Chloromethylketon
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2`-Desoxynucleotid-5`-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	Fast protein liquid chromatography
g	Gramm
h	Stunde(n)
His	Histidin
HPLC	High performance liquid chromatography
Htr	High temperature requirement protein
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
k	Kilo (10 ³)
kb	Kilobasen
K _d	Dissoziationskonstante
Km	Kanamycin
l	Liter
m	Milli (10 ⁻³)
M	Molar
min	Minute

MS	Massenspektrometrie
n	Nano (10^{-9})
NBT	Nitroblautetrazolium
Ni-TED	Nickel-tris-carboxymethylethylendiamin
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
NZA	NZ-Amin
OD	optische Dichte
OMP	Außenmembranprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pNA	p-Nitroanilin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ss	Signalsequenz
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	Unit
üN	über Nacht
üT	über Tag
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
VIS	sichtbares Licht
v β -Casein	verdautes β -Casein / Proteolysefragmente eines β -Casein-Komplettverdaus
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
α	Alpha
β	Beta
ΔA_{405}	Absorptionsänderung bei 405 nm
λ	Lambda
μ	Mikro (10^{-6})
σ	Sigma

1 Zusammenfassung

Das periplasmatische Hitzeschockprotein DegP spielt eine entscheidende Rolle in der bakteriellen Proteinqualitätskontrolle und besitzt eine Doppelfunktion als Protease und Chaperon. Es gehört zu der konservierten Familie der HtrA-Proteasen, deren Mitglieder eine katalytische Serinproteasedomäne mit mindestens einer PDZ-Domäne kombinieren und wichtige physiologische Funktionen in lebenden Zellen einnehmen. DegP wird in seiner Proteaseaktivität temperaturabhängig und allosterisch aktiviert. Der allosterische Mechanismus dominiert dabei die temperaturabhängige Aktivierung und geht einher mit einer Verschiebung des oligomeren Zustandes vom hexameren Ruhezustand zu proteolytisch aktiven 12 und 24meren Partikeln. Während diese Erkenntnisse primär auf strukturellen Daten basieren, ist der zugrunde liegende Mechanismus bisher nicht vollständig geklärt. Ziel dieser Arbeit war es daher, neue mechanistische Einblicke in die DegP-Aktivierung und Oligomerisierung zu gewinnen. Dazu wurden Mutationsanalysen mit Enzymtests, *in vivo* Komplementationstests, Oligomerisierungs- und Bindungsstudien sowie massenspektrometrischen Untersuchungen kombiniert. Der Fokus wurde dabei insbesondere auf die PDZ1-Domäne gerichtet. Darüber hinaus wurden die Loops L3 und L2 der Proteasedomäne genauer untersucht.

Die Ergebnisse der Analysen bestätigten den postulierten Zusammenhang der Aktivierung und Oligomerisierung und resultierten in einem möglichen mechanistischen Modell der DegP-Regulation. Es wurde gezeigt, dass 7mere und 10mere Peptide im Zuge der Aktivierung spezifisch an die PDZ1-Domäne binden und strukturelle Umorientierungen in der Proteasedomäne induzieren. Dabei findet eine Kommunikation zwischen den Elementen PDZ1, Loop L3, Loop LD und Loop L2 statt, die letztendlich zu der Ausbildung eines intakten aktiven Zentrums führt. Die aktive Form des Proteins assembliert zu 12 und 24meren Homooligomeren, die einen Innenraum für die hoch effiziente Degradation des Proteinsubstrats zur Verfügung stellen.

Mittels Bindungsstudien wurde in diesem Zusammenhang eine direkte Korrelation zwischen der Stärke der Peptidbindung und dem Grad der DegP-Aktivierung und Oligomerisierung gezeigt. Außerdem wurde gezeigt, dass die PDZ1-Domäne eine essentielle Rolle für die enzymatische Aktivität, die Aktivierung und die Oligomerisierung einnimmt. Im Weiteren konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass die PDZ1-Domäne und das aktive Zentrum ähnliche Sequenzspezifitäten besitzen, was eine prozessive Hydrolyse der DegP-Substrate ermöglicht, bei der die PDZ1- und Proteasedomäne miteinander kooperieren. Darüber hinaus

gaben die Analysen der Loops L3 und L2 Aufschluss über die bedeutsame Rolle dieser Elemente für die proteolytische Aktivität, die Aktivierung und die Oligomerisierung.

Mit dem in dieser Arbeit aufgestellten mechanistischen Modell wurde ebenfalls zu der Klärung der Frage beigetragen, wie DegP zwischen reparierbaren und degradierbaren Substraten unterscheidet. Demnach bestimmen Substrate ihr Schicksal selbst mit, indem sie die Faltung des Hexamers und der höheren aktiven Oligomere selbst initiieren und DegP auf diese Weise allosterisch aktivieren. Während ungefaltete Proteine prozessiv degradiert werden, werden gefaltete Moleküle vermutlich im Innenraum des aktiven DegP vor der Proteolyse geschützt und reparierbare Proteine in der Rückfaltung unterstützt.

In einem weiteren Schritt dieser Arbeit wurden neue DegP-Aktivatoren identifiziert. Dabei handelte es sich zum einen um den Aktivator DPMFKLV, der im Verlauf der Arbeit bereits erfolgreich für die Aufklärung des Aktivierungsmechanismus eingesetzt wurde. Das Screening einer *E. coli* Peptidbibliothek führte zum anderen zu der Identifizierung der zwei Aktivatorpeptide CHSAFPVFL und DYFGSALLRV, die die C-Termini zweier *E. coli* Zellhüllproteine darstellen.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit können zukünftig zu der Aufklärung der Regulationsmechanismen anderer HtrA-Proteasen beitragen. Von medizinischem Interesse ist in diesem Zusammenhang zum Beispiel das humane HtrA1, dem eine Rolle in der Tumorentstehung und Progression sowie in Proteinfaltungskrankheiten wie Arthritis, Morbus Parkinson und der Alzheimerschen Krankheit zugesprochen wird.

2 Einleitung

2.1 *Escherichia coli*

2.1.1 *E. coli* als Modellorganismus

Escherichia coli ist ein fakultativ anaerobes Bakterium, das zu der Familie der *Enterobacteriaceae* gehört. Diese Familie lässt sich in die Klasse der γ -Proteobacteria einordnen, dessen Vertreter ausschließlich Gram negativ sind. Während Gram positive Bakterien eine durchgehende Zellwand besitzen, weisen Gram negative Bakterien eine Innen- und eine Außenmembran mit einem Zwischenraum, dem so genannten Periplasma, auf (Gram, 1884; Brock *et al.*, 2000). Erstmals entdeckt und auch beschrieben wurde *E. coli* im Jahr 1886 von dem Kinderarzt Theodor Escherich (Oberbauer, 1992). Bei dem natürlichen Habitat des Bakteriums handelt es sich um den Darm des Menschen und warmblütiger Tiere, in dem es eine wichtige Rolle bei der Synthese von Vitaminen und der Verwertung von Sauerstoff spielt. Da *E. coli* auch außerhalb des Darms gut überleben kann und leicht nachzuweisen ist, wird es heute als Indikator für fäkale Trinkwasserverunreinigungen genutzt. Im Gegensatz zu früheren Ansichten, es gäbe nur wenige pathogene *E. coli*-Stämme, konnten in neueren Studien vermehrt pathogene Stämme identifiziert werden. Diese können Harnwegsinfektionen, ruhrähnliche Infektionen, Fieber oder Diarrhöe hervorrufen.

Aufgrund der einfachen Kultivierung, des schnellen Wachstums und der enormen Kenntnisse über *E. coli* gilt es heute als Modellorganismus für die Forschung und wird in diesem Zusammenhang häufig als Werkzeug für biochemische, genetische und physiologische Untersuchungen eingesetzt.

2.1.2 Die Morphologie von *E. coli*

E. coli weist eine stäbchenförmige Morphologie auf und besitzt peritriche Flagellen zur Fortbewegung. Eine schematische Darstellung der Struktur von *E. coli* ist in Abb. 2-1 zu sehen. Das Zellinnere des Bakteriums besteht aus dem Cytoplasma, in dem sich das Nucleoid und die Ribosomen befinden. Während das Nucleoid das genetische Material der Zelle darstellt, werden an den Ribosomen Zellproteine synthetisiert. Weiterhin beinhaltet das Cytoplasma Vitamine, Ionen, Zucker, Kohlenhydrate, Fett-, Nuklein- und Aminosäuren sowie Proteine.

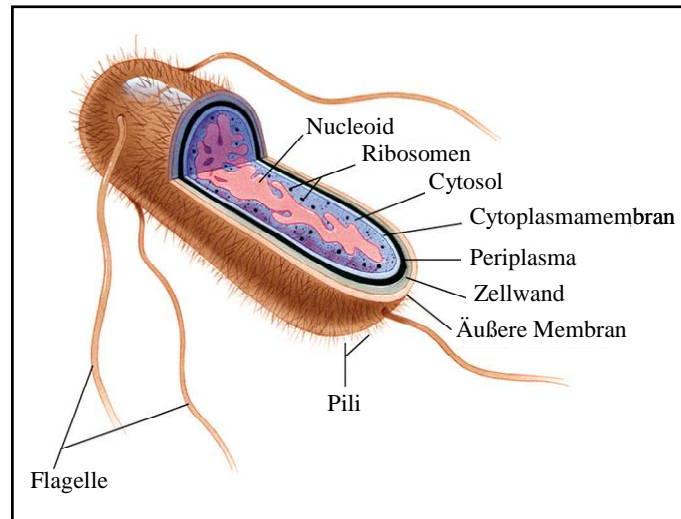


Abb. 2-1: Schematische Darstellung von *E. coli* (Nelson und Cox, 2000, modifiziert)

Die Zellhülle des Gram negativen Bakteriums setzt sich aus der Cytoplasmamembran, dem Periplasma und der Außenmembran zusammen (siehe Abb. 2-2).

Die Cytoplasmamembran, auch innere Membran genannt, begrenzt das Cytoplasma zum Periplasma hin und ist 8 nm dick. Sie besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht, in die zahlreiche Proteine eingebettet sind, und stellt eine mechanische und eine hochselektive Barriere dar (Sato *et al.*, 1977; Nou und Kadner, 1998). Während sie für lipophile und ungeladene Substanzen eher permeabel ist, können geladene hydrophile Substanzen nicht passieren und müssen von selektiven Transportproteinen im- bzw. exportiert werden (Boyd *et al.*, 1987; Boyd *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2006; Driessen und Nouwen, 2008). Des Weiteren dient die innere Membran der Energiespeicherung und -erzeugung, da in ihr Strukturen der Atmungskette sowie der elektrochemischen Gradientenpumpe verankert sind.

Der periplasmatische Raum, der zwischen der äußeren Oberfläche der Cytoplasmamembran und der inneren Oberfläche der äußeren Membran liegt, ist unter normalen osmotischen Bedingungen etwa 50 nm dick und macht circa 30% des Zellvolumens aus (van Wielink und Duine, 1990; Wülfing und Plückthun, 1994). In diesem Bereich befindet sich unter anderem das Peptidoglykan, das eine quervernetzte Schicht aus Zuckerderivaten (N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure) und Aminosäuren darstellt. Bei *E. coli* macht diese Schicht in etwa zehn Prozent der Trockenmasse der Zellwand aus und trägt hauptsächlich zur Stabilität sowie zur Rigidität gegen osmotischen Stress bei.

Neben dem Peptidoglykan befinden sich außerdem rund 150 verschiedene Proteine im Periplasma. Die hohe Konzentration dieser Proteine führt zu einer eher viskosen Konsistenz des Periplasmas (Brass *et al.*, 1986). Dazu gehören Proteasen, Chaperone, Faltungs-

katalysatoren, Bestandteile von ABC-Transportern, Enzyme für die Biosynthese der Zellwand und den Metabolismus der Zelle und Proteine, die an der Zellteilung und Virulenz beteiligt sind. Im Gegensatz zu den Proteinen des Cytoplasmas sind sie aufgrund des Fehlens von Nukleotiden im Periplasma ATP-unabhängig. Da Proteine der Zellhülle im Cytoplasma synthetisiert werden und nicht passiv über die Cytoplasmamembran zum Zielort gelangen können, bedarf es eines Translokationssystems über die Membran. Während die meisten Proteine ungefaltet über die klassische Sekretionsmaschinerie (*Sec-Pathway*) transportiert werden, gelangt nur ein kleiner Teil der Zellhüllproteine gefaltet über den TAT-Weg (*twin arginine pathway*) in das Periplasma (van Wely *et al.*, 2001; Danese und Silhavy, 1998; Palmer und Berks, 2003; Lee *et al.*, 2006; Driessen und Nouwen, 2008).

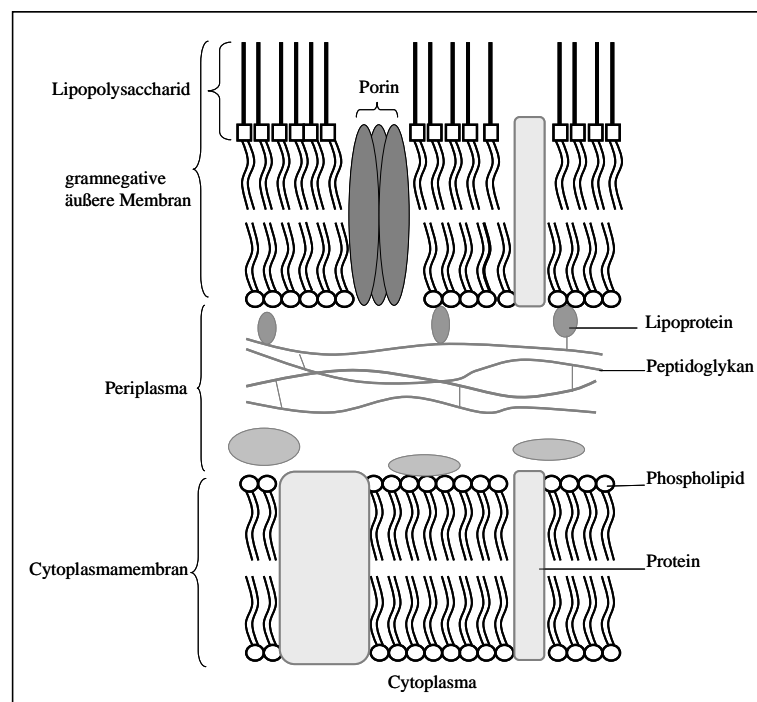


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Zellwand des Gram negativen Bakteriums *E. coli*

Gram negative Bakterien enthalten eine zusätzliche äußere Membran. Diese setzt sich asymmetrisch aus nach innen gerichteten Phospholipiden und nach außen gerichteten Lipopolysacchariden zusammen und grenzt die Zelle nach außen hin ab (Muhlradt und Golecki, 1975). Im Gegensatz zur inneren Membran ist sie permeabel für kleine Moleküle (bis ca. 600 Da), da in ihr die so genannten Porine eingelagert sind. Es handelt sich dabei meist um trimere Porine, die eine β -Fasstruktur besitzen und so Kanäle bilden, durch die kleine hydrophile Substanzen passieren können. Beispiele solcher Außenmembranproteine sind OmpC, OmpF sowie OmpA (Gordon *et al.*, 1984; Barbas *et al.*, 1985; Koebnik, 2000;

Kleinschmidt, 2003; Baslé *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2008). Neben den Porinen enthält die äußere Membran auch andere Proteine, wie zum Beispiel Rezeptoren und Lipoproteine. Während die hochaffinen Rezeptoren einen substratspezifischen Transport vermitteln (Nikaido, 1996), bilden die Lipoproteine Verbindungsglieder zwischen Außenmembran und Peptidoglykan und vermitteln so Veränderungen des Umgebungsdrucks, um eine Beschädigung der Zelle zu verhindern (Koch, 1998). Insgesamt konnten bisher um die 320 Proteine in der Außenmembran von *E. coli* identifiziert werden (Ehrmann, 2005).

2.2 Proteinqualitätskontrolle

Die für die Faltung eines Proteins notwendigen Informationen sind in seiner Aminosäuresequenz enthalten (Afinsen und Haber, 1961; Afinsen, 1973). Trotzdem kontrollieren und unterstützen Faltungskatalysatoren, Chaperone und Proteasen den Proteinfaltungsprozess *in vivo* (Ellis und Hartl, 1999; Young *et al.*, 2004; Miot und Betton, 2004). Sind Zellen Stress wie zum Beispiel Hitze oder Hyperosmolarität ausgesetzt, so kann dies zu Fehlfaltungen von Proteinen und zur anschließenden Akkumulation von Proteinaggregaten führen (Goff und Goldberg, 1985; González-Montalbán *et al.*, 2005). Da das Anhäufen von Aggregaten zum Zelltod führen kann, bedarf es einer ausreichenden Stressantwort, die in diesem Fall über die Degradation oder Reparatur der fehlgefalteten Proteine stattfindet. Im Cytoplasma von *E. coli* erfolgt die Stressantwort hauptsächlich über die so genannten Hitzeschockproteine, zu denen sowohl Chaperone als auch Proteasen gehören. Während Chaperone fehlgefaltete Proteine erkennen und die Rückfaltung unterstützen, degradieren Proteasen Proteine, die nicht mehr rückgefaltet werden können (Goff und Goldberg, 1985; Wickner *et al.*, 1999; Houry, 2001; González-Montalbán *et al.*, 2005). Im Vergleich zum Cytoplasma ist das Periplasma Veränderungen des externen Milieus direkter ausgesetzt, da es nur über die poröse Außenmembran von diesem getrennt ist. Außerdem unterscheidet sich das Periplasma in einigen chemischen Gegebenheiten wesentlich vom Cytoplasma. Dazu gehören die Abwesenheit von ATP (Rosen, 1987) sowie die oxidierenden Bedingungen im Periplasma (Oliver, 1996). Aufgrund dieser Tatsachen bedarf es im Periplasma einer eigenen Proteinqualitätskontrolle.

2.2.1 Chaperone

Molekulare Chaperone erkennen hydrophobe Oberflächenstrukturen falsch oder ungefalteter Proteine. Sie unterstützen die Faltung neu synthetisierter Proteine sowie die Rückfaltung denaturierter Proteine und verhindern auf diese Weise die Assemblierung von Proteinaggregaten (Wülfing and Plückthun 1994; Bukau, 1999; Saibil, 2008). Dabei lassen sie

sich in ATP-abhängige und ATP-unabhängige Chaperone unterteilen. (Beissinger and Buchner, 1998). Viele der heute bekannten Chaperone wurden ursprünglich als Hitzeschockproteine identifiziert, da sie bei erhöhter Temperatur vermehrt in der Zelle exprimiert werden. Hitzeschockproteine (Hsp; *heat shock proteins*) werden anhand ihrer Molekülmasse in sechs verschiedene Familien unterteilt. Dabei kann zwischen den Familien Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp110 und der Familie der so genannten kleinen Hitzeschockproteine (z.B. Hsp27 mit einer Masse von 27 kDa) unterschieden werden.

Das bakterielle ATP-abhängige Chaperon GroEL gehört zu der Gruppe der Hsp60-Proteine (Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1991; Braig *et al.*, 1994; Hartl, 1996; Ranford und Hernderson, 2002; Georgopoulos, 2006; Li *et al.*, 2009). Zusammen mit dem Cochaperon GroES ist es für die korrekte Faltung einer Vielzahl von zellulären Proteinen verantwortlich. Es besteht aus zwei heptameren Ringen, die eine Käfig-ähnliche Struktur bilden und deren Innenraum hauptsächlich durch hydrophobe Aminosäurereste ausgekleidet wird.

Das Hsp70-Protein DnaK stellt ein weiteres klassisches ATP-abhängiges bakterielles Chaperon dar, das an der korrekten Faltung und Rückfaltung vieler Proteine beteiligt ist (Tavaria *et al.*, 1996; Georgopoulos, 2006; Genevoux *et al.*, 2007). Wie GroEL ist es im Cytoplasma lokalisiert und bei Zellstress in seiner Expression hochreguliert. Es liegt als Monomer vor und besitzt eine nur schwache ATPase-Aktivität, so dass es auf Cochaperone angewiesen ist. Während das Chaperon DnaJ die ATP-Hydrolyse vermittelt, ist das Protein GrpE für die Substitution des ADP durch ATP verantwortlich (Beissinger und Buchner, 1998).

Auch in der bakteriellen Zellhülle ist die Existenz von molekularen Chaperonen und Faltungskatalysatoren notwendig. Proteine der Zellhülle von *E. coli* werden mit N-terminaler Signalsequenz im Cytoplasma synthetisiert und gelangen über verschiedene Wege in den periplasmatischen Raum (siehe 2.1.2). Da die Translokation über die Membran meist nur ungefaltet erfolgt, ist eine Faltung im Periplasma notwendig. Zu den in diesem Zusammenhang gut untersuchten Proteinfaltungskatalysatoren gehören die Disulfidisomerasen DsbA, DsbC, und DsbG der Dsb-Familie (Bardwell *et al.*, 1991; Peek und Taylor, 1992; Prinz *et al.*, 1997; Berkmen *et al.*, 2007) sowie die Prolinisomerasen FkpA, SurA, PpiD und PpiA (Göthel und Marahiel, 1999; Fischer und Aumüller, 2003). Dabei konnte FkpA und SurA eine zusätzliche Chaperonaktivität nachgewiesen werden (Arié *et al.*, 2001; Rizzitello *et al.*, 2001). Auch bezüglich der zwei Disulfidisomerasen DsbC und DsbG wurde eine Chaperonaktivität gezeigt (Chen *et al.*, 1999; Shao *et al.*, 2000).

Während die Chaperone des Cytoplasmas von *E. coli* gut untersucht sind (Bukau und Horwich, 1998), konnten bisher nur wenige „echte“ molekulare Chaperone im Periplasma identifiziert und charakterisiert werden. Das am besten untersuchte periplasmatische Chaperon in *E. coli* ist Skp. Es handelt sich dabei um ein 17 kDa großes Protein, das als Homotetramer vorliegt und das Falten von Außenmembranproteinen und rekombinanten Antikörperfragmenten unterstützt (Thome und Müller, 1991; Wülfing und Plückthun, 1994). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Skp das neu synthetisierte Außenmembranprotein PhoE unmittelbar nach der Translokation über die Cytoplasmamembran bindet (Harms *et al.*, 2001). Während der *skp*-Knockout in *E. coli* nicht lethal ist und lediglich zu einer reduzierten Produktion von Außenmembranproteinen führt (Chen und Henning, 1996), führt der Doppel-Knockout von *skp* und *degP* (siehe 2.5) zu einem lethalen Phänotyp (Schäfer *et al.*, 1999).

2.2.2 Proteasen

Proteasen sind Enzyme, die Peptidbindungen hydrolysieren und anhand des Aufbaus des aktiven Zentrums bzw. des an der Katalyse beteiligten Metallions in sieben Klassen eingeteilt werden können. Dabei handelt es sich um die Klassen der Serin-, Cystein-, Aspartat-, Threonin-, Glutamat-, Metalloproteasen und der so genannten unbekannten Proteasen, die zusammengenommen in 52 Clans mit 205 Familien aufgeteilt werden. Proteasen sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt, wobei sie abbauend, schützend oder regulatorisch wirken können. Während sie in ihrer digestiven Funktion Nährstoffe zur Energiegewinnung degradieren, sind sie in ihrer protektiven Funktion an dem Abbau falsch gefalteter oder falsch lokalisierter Proteine beteiligt, die andernfalls aggregieren und eventuell zum Zelltod führen würden. Regulatorische Proteasen aktivieren oder inaktivieren andere Proteine, die an Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind (Gottesmann, 2003; Barret *et al.*, 2004; Ehrmann und Clausen, 2004). Die vielseitigen Funktionen und Aufgaben von Proteasen verdeutlichen, dass jede Zelle eine Vielzahl an Proteasen benötigt, wobei jedes zelluläre Kompartiment sein eigenes Repertoire enthalten muss. In *E. coli* konnten bereits 74 Proteasen nachgewiesen werden. Im Periplasma wurden bisher 20 Proteasen identifiziert, wobei davon neun zu der Klasse der Serinproteasen, sechs zu der Klasse der Metalloproteasen, drei zu der Klasse der Cysteinproteasen und zwei zu der unbekannten Proteaseklasse gehören.

2.3 Serinproteasen

Etwa 35% der unter der MEROPS Datenbank¹ dokumentierten Proteasen gehören zu der Klasse der Serinproteasen (Rawlings und Barrett, 1994; Rawlings *et al.*, 2004). Sie wurden nach dem nukleophilen Serinrest im aktiven Zentrum benannt und konnten in Eukaryoten, Viren und Bakterien identifiziert werden. Dabei können Serinproteasen in 50 Familien unterteilt und diese wiederum in neun Clans eingruppiert werden (Rawling und Barrett, 2004). An dem katalytischen Mechanismus, der Hydrolyse von Peptidbindungen, ist neben dem Serin eine weitere Aminosäure beteiligt, die als Protonendonator fungiert und bei der es sich in den meisten Clans um ein Histidin handelt. Zu der richtigen Orientierung des Imidazolrings des Histidins trägt meist ein Aspartat bei (Perona und Craik, 1995; Hedstrom, 2002; Rawlings und Barrett, 2004). Eine detaillierte Darstellung des katalytischen Mechanismus ist in Abb. 2-3 dargestellt. Während sich diese Darstellung auf den klassischen generell akzeptierten Reaktionsmechanismus bezieht, der auf dem der Serinprotease Chymotrypsin basiert, findet die Hydrolyse der Peptidbindungen bei neu entdeckten Clans in leicht modifizierter Form statt (Polgár, 2004).

Zu den am besten untersuchten Serinproteasen bei Säugern zählen Chymotrypsin und Trypsin (Kraut, 1977; Steitz und Shulman, 1982; Hedstrom, 2002; Rawlings und Barrett, 2004; Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Sie nehmen eine wichtige Rolle im Verdauungssystem von Säugern ein und lassen sich in die Familie S1 des Clans PA einordnen. Bei dieser Familie handelt es sich um die größte aller Proteasefamilien, wobei all ihre Mitglieder Endopeptidasen sind. Alle Vertreter dieser Familie besitzen eine hoch konservierte Struktur mit der in Abb. 2-3 klassischen katalytischen Triade. Eine weitere Gruppe von Serinproteasen der Familie S1 bilden die HtrA (*high temperature requirement*)-Proteasen, die sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten vorkommen (siehe 2.4).

¹ <http://www.bi.bbsrc.ac.uk/Merops/Merops.htm>

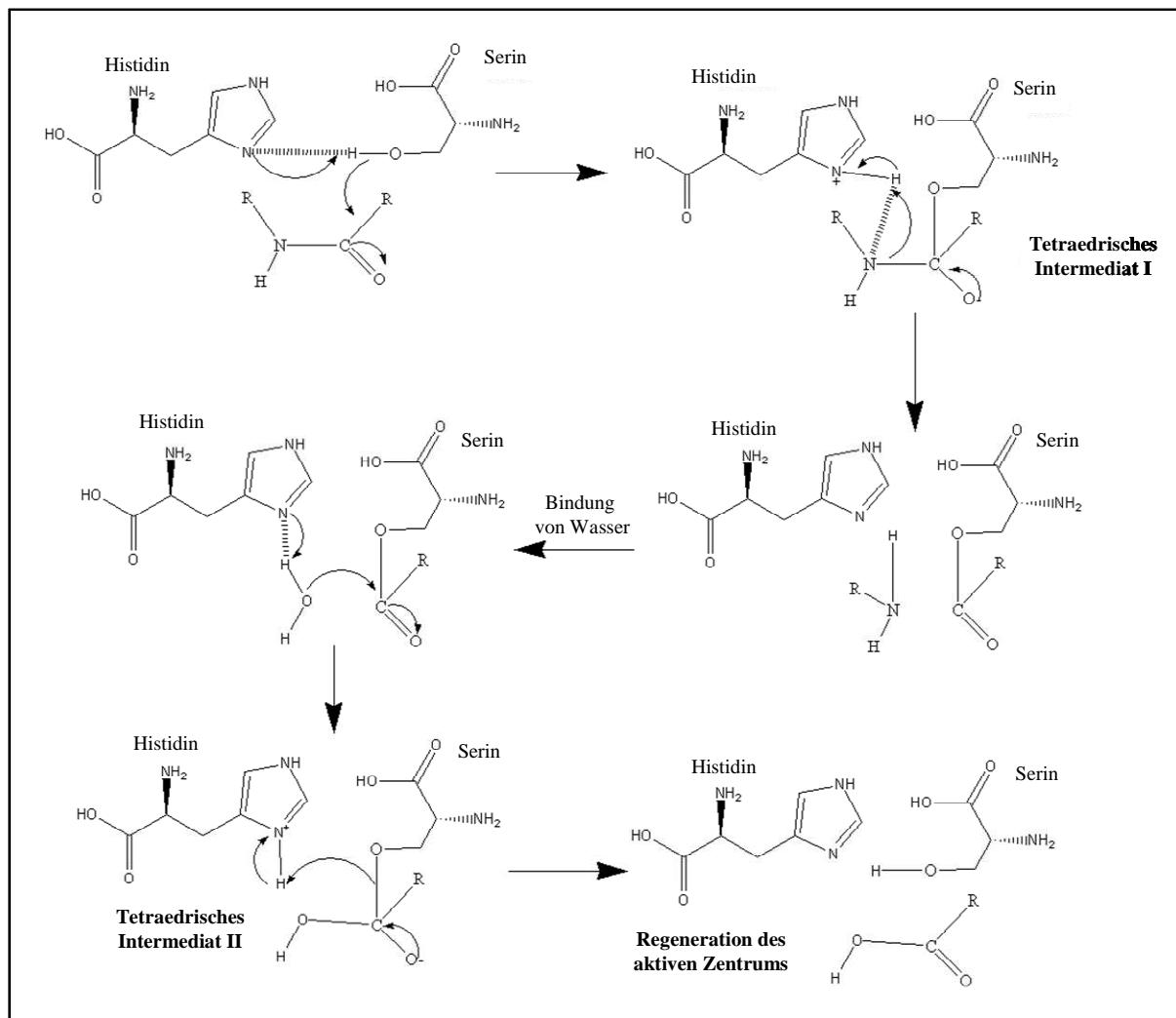


Abb. 2-3: Hydrolyse einer Peptidbindung durch eine Serinprotease

In der Abbildung ist der klassische katalytische Mechanismus bei der Hydrolyse von Peptidbindungen durch eine Serinprotease dargestellt (Quelle: Grau, 2004; modifiziert).

Serin, Histidin und Aspartat bilden eine katalytische Triade. Ohne Substrat liegt das Histidin nicht protoniert vor. Die Hydrolyse beginnt mit dem Angriff des Sauerstoffs der Hydroxylgruppe des Serins auf den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung. Die Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung dieser Carbonylgruppe wird zur Einfachbindung und das Sauerstoffatom bekommt eine negative Nettoladung. In dieser Phase liegt ein tetraedrisches Zwischenprodukt vor. Die Bildung dieses Zwischenprodukts wird durch die Wasserstoffbrücken zwischen dem negativ geladenen Carbonylsauerstoff und den zwei NH-Gruppen ermöglicht. Diese Stelle wird als Oxyaniontasche bezeichnet. Außerdem wird ein Proton vom Serin auf das Histidin übertragen und das Aspartat bringt den Imidazolring des Histidins in die richtige Position und neutralisiert dessen positive Ladung. Das Proton des Histidins wird dann auf das Stickstoffatom der Peptidbindung übertragen und diese gespalten. Nachdem die Aminokomponente abdiffundiert ist, nimmt ein Wassermolekül den Platz der Aminokomponente des Substrats ein. Das Histidin zieht ein Proton vom Wasser ab, das verbleibende OH^- -Ion greift das Carbonylkohlenstoffatom der an dem Serin gebundenen Acylgruppe an und es entsteht ein tetraedrisches Zwischenprodukt. Anschließend gibt das Histidin ein Proton an das Sauerstoffatom des Serins ab. Dadurch wird der gebundene C-Terminus des Substrates freigesetzt.

2.4 HtrA-Proteasen

HtrA-Proteasen repräsentieren eine neue Klasse homooligomerer Serinproteasen der Familie S1. Das charakteristische Merkmal dieser Familie ist die Kombination einer Proteasedomäne mit mindestens einer PDZ-Domäne (siehe 2.6). Bei PDZ-Domänen handelt es sich um Proteinmodule, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, indem sie die C-Termini der Zielproteine binden (Pallen und Wren, 1997). Als erstes Mitglied der HtrA-Familie in *E. coli* wurde DegP identifiziert. Es wurde festgestellt, dass die Deletionsmutante die Fähigkeiten verliert, bei höheren Temperaturen zu wachsen (Lipinska *et al.*, 1988; Strauch *et al.*, 1989) und fehlgefaltete periplasmatische Proteine zu degradieren (Strauch und Beckwith, 1988). Bis heute konnten über 180 Mitglieder der HtrA-Familie in RNA-Viren, Prokaryonten und Eukaryoten identifiziert werden. Abb. 2-4 zeigt die Domänenorganisation einiger HtrA-Proteasen aus verschiedenen Spezies. Dabei variiert die Länge der jeweiligen Sequenzen meist zwischen 350 und 450 Aminosäuren und nur in einigen Ausnahmen konnten längere Sequenzen von bis zu 1100 Aminosäuren identifiziert werden.

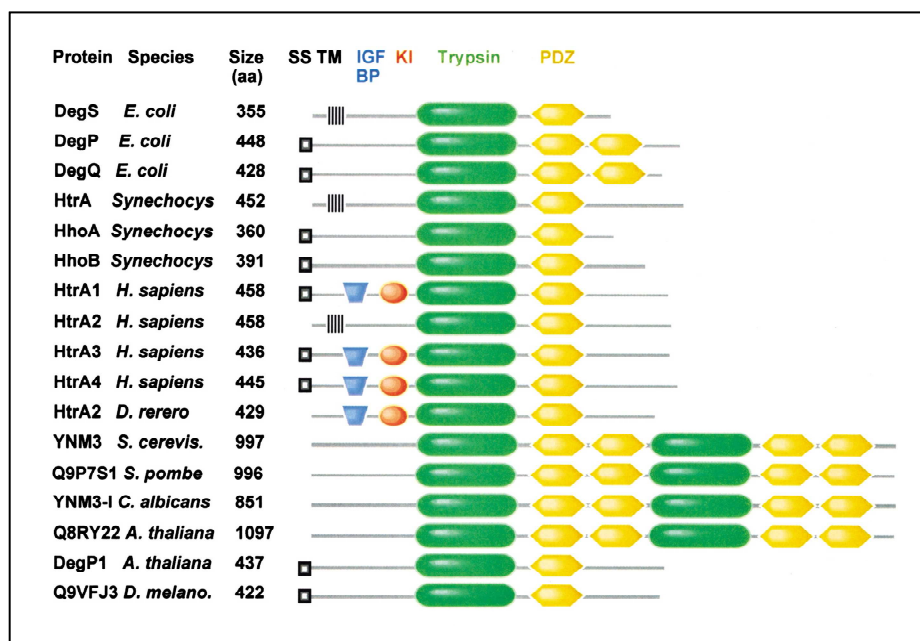


Abb. 2-4: Aufbau der HtrA-Proteasen (Clausen *et al.*, 2002)

Dargestellt ist die Domänenorganisation einiger Vertreter der HtrA-Familie verschiedener Spezies. Die Größe der hier gezeigten Proteine variiert zwischen 355 und 1097 Aminosäuren. aa: Aminosäuren; SS: Signalsequenz; TM: Transmembransegment; IGF BP: Insulinwachstumsfaktor bindende Domäne (*insulin growth factor binding domain*); KI: Kazalproteaseinhibitor-domäne; Trypsin: Chymotrypsin/Trypsin-ähnliche Protease-Domäne; PDZ: PDZ-Domäne.

Bereits viele Funktionen in verschiedenen biologischen Prozessen konnten den HtrA-Proteasen zugesprochen werden. Sie spielen eine Rolle in der Stressantwort von Zellen und sind differenziell reguliert bei Krankheiten wie Krebs, Arthritis und der Alzheimerschen Krankheit. Für das Mitglied DegP wurde neben der Proteasefunktion auch eine Chaperonfunktion nachgewiesen (siehe 2.5).

Humane HtrA-Proteasen können bezüglich der Domänenorganisation in zwei Klassen eingeteilt werden (siehe Abb. 2-4). Dabei besitzt das mitochondriale HtrA2 einen Transmembrananker sowie einen N-terminalen Bereich, der durch Prozessierung entfernt werden kann. Zu der zweiten Klasse gehören HtrA1, HtrA3 und HtrA4. Bei ihnen konnten zusätzliche Signalpeptide an den N-Termini identifiziert werden, die als IGF-Bindedomänen und Proteaseinhibitor-domänen beschrieben sind (Clausen *et al.*, 2002).

Im Jahr 2002 lösten Li *et al.* die Struktur von HtrA2 und zeigten, dass sich drei Monomere zu einer Pyramidenartigen Struktur zusammenlegen, die essentiell ist für die proteolytische Aktivität (Li *et al.*, 2002). Der Funktionsverlust von HtrA2 oder die Deletion der Serinprotease führt in Mäusen zu einer mitochondrialen Dysfunktion, die eine Bewegungsstörung verursacht (Jones *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2004). Im Menschen steht ein Funktionsverlust von HtrA2 in Verbindung mit der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Parkinson (Strauss *et al.*, 2005; Plun-Favreau *et al.*, 2007; Bogaerts *et al.*, 2008). Moiso *et al.* belegten außerdem, dass die HtrA2-Deletion in menschlichen Neuronen zu einer Akkumulation ungefalteter mitochondrialer Proteine, zu einem Defekt in der mitochondrialen Respiration und zu einer erhöhten Konzentration von Sauerstoffradikalen führt (Moiso *et al.*, 2009). Neuere Studien postulieren ebenfalls eine Rolle in der Entstehung der Alzheimerschen Krankheit (Park *et al.*, 2004; Huttunen *et al.*, 2007; Kooistra *et al.*, 2009) und in der Krebsentstehung (Narkiewicz *et al.*, 2009).

Von sehr großem medizinischem Interesse ist das humane HtrA1. Ursprünglich wurde es als Gen isoliert, dessen Expression nach der Transformation von Fibroblasten mit SV40 herunter reguliert war (Zumbrunn und Trueb, 1996). Es wurde gezeigt, dass die Protease sowohl im Ovarialkarzinom als auch in malignen Melanomen herunter reguliert ist (Shirdhar *et al.*, 2002) und die Überexpression von HtrA1 in invasiven Melanomen zu einer Suppression der Proliferation und Migration der Tumorzellen führt (Baldi *et al.*, 2002). Auch neuere Studien belegen eine Korrelation der HtrA1-Expression mit der Tumorentstehung und -progression und deuten auf HtrA1 als ein potentiell Target in der Krebstherapie hin (Chien *et al.*, 2004; Esposito *et al.*, 2006; Bowden *et al.*, 2006; Baldi *et al.*, 2008; Chien *et al.*, 2009). Eine weitere Rolle konnte HtrA1 in dem Krankheitsbild der Arthritis zugesprochen werden. Es

wurde festgestellt, dass die HtrA1-Expression in Chondrozyten von Patienten mit Osteoarthritis erheblich hochreguliert ist (Hu *et al.*, 1998; Tsuchiya *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007b). Hara *et al.* zeigten eine direkte Assoziation der Krankheit mit Mutationen im HtrA1-Gen (Hara *et al.*, 2009). Einen weiteren medizinisch relevanten Zusammenhang von HtrA1 stellte man mit der Alzheimerschen Krankheit fest. Grau *et al.* zeigten, dass die Abwesenheit von HtrA1 zu der erhöhten Aggregation des Amyloid β (A β) führt (Grau *et al.*, 2005). A β akkumuliert im Zuge der Alzheimerschen Krankheit in den Zellwänden von Blutgefäßen und in senilen Plaques im Gehirn (Selkoe, 2001).

Neben den humanen HtrA-Proteasen konnten bisher die drei Vertreter DegP, DegS und DegQ in *E. coli* identifiziert werden, die alle im Periplasma aktiv sind. Während DegS im Unterschied zu DegP und DegQ einen N-terminalen Transmembrananker aufweist und nur eine PDZ-Domäne besitzt, haben DegP und DegQ zwei PDZ-Domänen. Dabei weisen letztere eine Sequenzhomologie von knapp 60% auf und haben vermutlich eine ähnliche Substratspezifität. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Phänotyp der *degP*-Deletionsmutante teilweise durch die Überexpression von *degQ* aufgehoben werden kann (Kolmar *et al.*, 1996, Waller und Sauer, 1996).

Bei DegS handelt es sich um einen membrangebundenen Stresssensor in der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle (Walsh *et al.*, 2003). Abbildung Abb. 2-5 zeigt die Kristallstruktur von DegS, das in der Zelle als Trimer vorliegt.

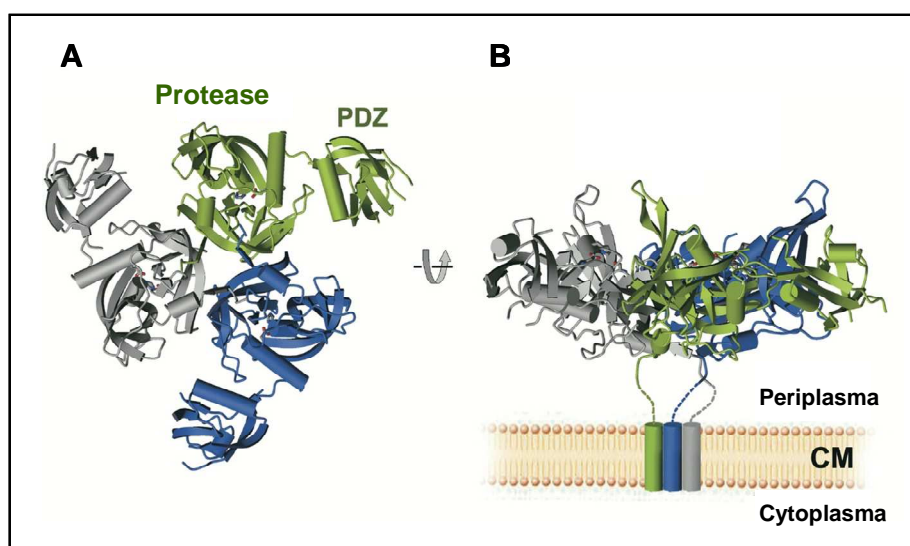


Abb. 2-5: Trimere Struktur von DegS (Wilken *et al.*, 2004, modifiziert)

A: Dargestellt ist die Aufsicht auf das DegS-Trimer. Die einzelnen Monomere sind in verschiedenen Farben dargestellt. Die Aminosäurereste der katalytischen Triade sind rot markiert.

B: Dargestellt ist die Seitenansicht auf das in der Membran verankerte DegS-Trimer. Die Aminosäurereste der katalytischen Triade sind rot markiert. CM = Cytoplasmamembran.

Während die Proteasedomänen im Zentrum des Trimers liegen, ragen die PDZ-Domänen nach außen heraus und binden hydrophobe C-Termini falsch gefalteter Außenmembranproteine. Diese Bindung führt zu einer Umorientierung einzelner Elemente von DegS, so dass das Protein allosterisch aktiviert wird. Die Aktivierung führt zu der Initiierung einer proteolytischen Signalkaskade (σ^E -Signalweg), die zu der Expression verschiedener Stressgene führt (siehe 2.5.1) (Walsh *et al.*, 2003; Ehrmann und Clausen, 2004; Wilken *et al.*, 2004; Hasselblatt *et al.*, 2007).

2.5 Die periplasmische Serinprotease DegP

E. coli DegP wurde erstmals im Jahr 1983 identifiziert und charakterisiert (Swamy *et al.*, 1983). Es gehört zu der S1-Familie des Clans PA der Serinproteasen und enthält die für diese Familie typische katalytische Triade (His-105, Asp-135, Ser-210) in einer konservierten N-terminalen chymotrypsinähnlichen Proteasedomäne (Aminosäuren 1-259). Außerdem besitzt das Monomer zwei C-terminale PDZ-Domänen (PDZ1: Aminosäuren 260-358; PDZ2: Aminosäuren 359-448) (siehe Abb. 2-4; Abb. 2-8), die der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen dienen (siehe 2.6) (Rawlings und Barret, 1994; Songyang *et al.*, 1997; Krojer *et al.*, 2002).

Es handelt sich bei DegP um eine periplasmatische Protease, die als 51 kDa großes Vorläufer-Protein mit einer N-terminalen Signalsequenz, die aus 26 Aminosäuren besteht, synthetisiert wird und nach Abspaltung der Sequenz ein Molekulargewicht von 48 kDa aufweist. Lipinska *et al.* belegten, dass *degP* ein Hitzeschockgen ist, das über zwei Signaltransduktionswege (σ^E ; CpxAR; siehe 2.5.1) reguliert wird (Lipinska *et al.*, 1988). In der bakteriellen Zellhülle spielt es eine zentrale Rolle in der Proteinqualitätskontrolle. Neben der Proteasefunktion, die bei höheren Temperaturen ausgeprägter ist, konnte DegP auch eine Chaperonfunktion zugeschrieben werden (Spiess *et al.*, 1999; Misra *et al.*, 2000; CastilloKeller und Misra, 2003; Krojer *et al.*, 2008a; Shen *et al.*, 2009).

2.5.1 Die Regulation der *degP*-Expression in der Zelle

Die *degP*-Expression ist unter Stressbedingungen, die mit Proteinfaltungsproblemen assoziiert sind, hochreguliert. Dabei findet die Regulation über ein komplexes System statt, das aus dem σ^E -Transkriptionsregulon und dem CpxA/CpxR Zweikomponentensystem besteht (Clausen *et al.*, 2002; Alba und Gross, 2004; Raivio, 2005). Beide Signalwege werden durch die Präsenz von fehlgefalteten periplasmatischen Proteinen aktiviert, leiten diese Signale über die Cytoplasmamembran weiter und stimulieren anschließend die Transkription

von Genen der Stressantwort im Cytoplasma (Danese *et al.*, 1995; Pogliano *et al.*, 1997; Dartigalongue *et al.*, 2001; Rhodius *et al.*, 2006).

In Abb. 2-6 ist der σ^E -Signalweg, über den mehr als 100 Gene reguliert werden, schematisch dargestellt (Chaba *et al.*, 2007). Er besteht aus dem alternativen Sigmafaktor RpoE, den Regulatoren RseA und RseB sowie aus den Proteasen DegS, RseP, ClpXP und Lon (Ades, 2004; Alba und Gross, 2004; Ehrmann und Clausen, 2004; Duguay und Silhavy, 2004; Ruiz und Silhavy, 2005).

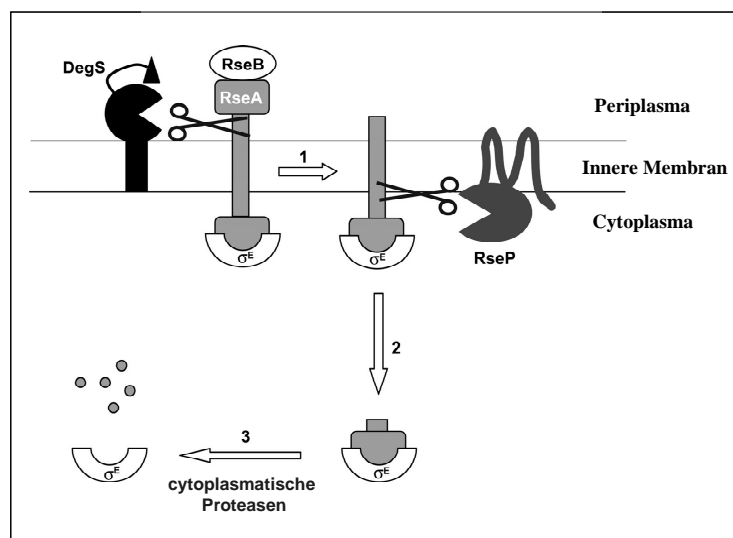


Abb. 2-6: σ^E -Signaltransduktionskaskade (Chaba *et al.*, 2007, modifiziert)

Dargestellt ist das σ^E -Transkriptionsregulon. Das aktivierte DegS schneidet primär den Antisigmafaktors RseA in seiner periplasmatischen Region (1). Anschließend wird RseA in seiner Transmembranregion von RseP geschnitten, wodurch die N-terminale Domäne von RseA mit dem gebundenen RpoE in das Cytoplasma entlassen wird (2). Weitere proteolytische Schritte durch cytoplasmatischen Proteasen führen zur Freisetzung von RpoE, so dass dieser als alternativer Sigmafaktor aktiv wird (3).

Unter stressfreien Bedingungen wird RpoE von dem Antisigmafaktor RseA, einem integralen cytoplasmatischen Membranprotein, gebunden und liegt inaktiv an der Innenmembran vor (Campbell *et al.*, 2003). Während die cytoplasmatische Domäne von RseA an RpoE bindet, bindet die periplasmatische Domäne an RseB (De Las Penas *et al.*, 1997; Missiakas *et al.*, 1997). Unter Stressbedingungen binden fehlgefaltete Proteine an die membrangebundene HtrA-Protease DegS und aktivieren diese (Walsh *et al.*, 2003; Wilken *et al.*, 2004). Das aktivierte DegS führt den Geschwindigkeitsbestimmenden ersten Schritt in der Signalkaskade durch, indem es RseA in seiner periplasmatischen Region schneidet. Anschließend wird RseA in seiner Transmembranregion von RseP geschnitten, wodurch die N-terminale Domäne von RseA mit dem gebundenen RpoE in das Cytoplasma entlassen wird

(Ades *et al.*, 1999; Alba *et al.*, 2002; Kanehara *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2003; Akiyama *et al.*, 2004). Weitere proteolytische Schritte durch die cytoplasmatischen Proteasen ClpXP und Lon führen zur Freisetzung von RpoE, so dass dieser als Sigmafaktor aktiv werden und an Promotoren der Stressantwort binden kann (Flynn *et al.*, 2004; Rhodius *et al.*, 2006; Chaba *et al.*, 2007). Zu den in diesem Zusammenhang hochregulierten Genen gehören *degP*, *rseA* und *rpoE* selbst. Zusätzlich führt die σ^E Transkriptionsregulation zu einer Herabregulation der Expression von Außenmembranproteinen (Clausen *et al.*, 2002).

Abb. 2-7 zeigt schematisch den Signaltransduktionsmechanismus über das CpxA/CpxR Zweikomponentensystem. Dieses setzt sich primär aus der Membran lokalisierten Sensorkinase CpxA und aus dem Responseregulator CpxR zusammen (Raivio und Silhavy, 1999; Raivio, 2005).

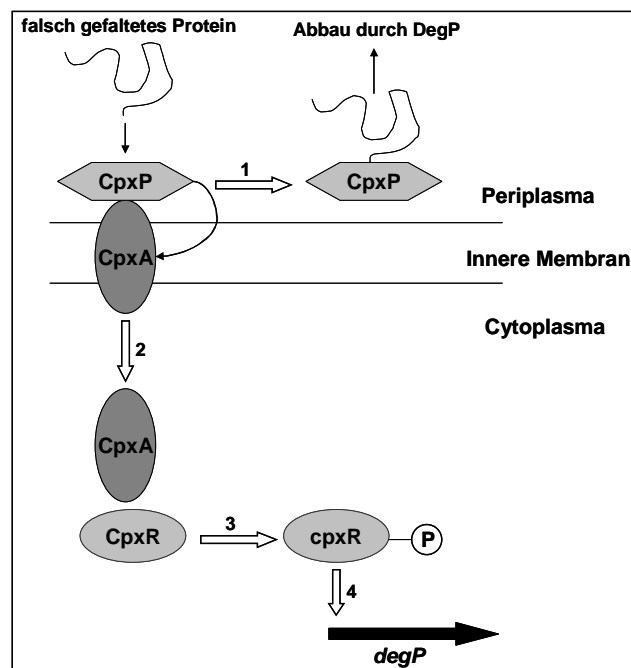


Abb. 2-7: Signaltransduktion über das CpxA/CpxR Zweikomponentensystem

Dargestellt ist die Transkriptionsregulation über das CpxA/CpxR Zweikomponentensystem. Unter Stressbedingungen binden falsch gefaltete Proteine an CpxP (1). Die Inhibition von CpxA wird aufgehoben es wird als Proteinkinase aktiv (2), phosphoryliert CpxR (3) und CpxR aktiviert die Transkription spezifischer Gene, unter anderem *degP* (4).

Unter stressfreien Bedingungen bindet und inhibiert das periplasmatische Protein CpxP die Kinase CpxA. Wird die Zelle Stressbedingungen ausgesetzt, binden falsch gefaltete Proteine des Periplasmas an CpxP und der Komplex wird von DegP abgebaut (Isaac *et al.*, 2005). Die Inhibition von CpxA wird aufgehoben, so dass es als Proteinkinase aktiv wird (Nakayama und Watanabe, 1995; Snyder *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997; Danese und Silhavy, 1998;

Danese *et al.*, 1998). CpxR wird phosphoryliert und kann so seine Funktion als Transkriptionsaktivator, der spezifisch an Promotoren für Gene der Stressantwort bindet, einnehmen (Pogliano *et al.*, 1997). Eines dieser Gene ist *degP*, dessen Expression durch den beschriebenen Mechanismus erhöht wird (Cosma *et al.*, 1995; Danese *et al.*, 1995; Pogliano *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 2006).

2.5.2 Die Struktur von DegP

Der funktionelle Baustein von DegP ist das Trimer, das durch die Interaktion der Proteasedomänen von drei Monomeren gebildet wird (siehe Abb. 2-8). Während die Proteasedomänen das eher starre Zentrum des Trimers bilden, ragen die PDZ-Domänen nach außen heraus. In ihrer Orientierung sind die PDZ-Domänen sehr flexibel und können so ihre Funktion als Substratfänger erfüllen (Clausen *et al.*, 2002).

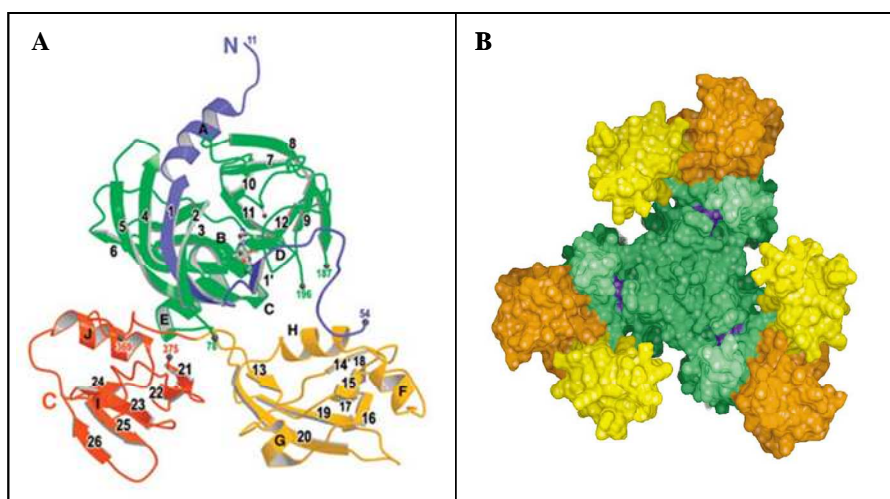


Abb. 2-8: Monomere und trimere Struktur von DegP

A: Dargestellt ist die Kristallstruktur des DegP-Monomers. Die Domänen sind in verschiedenen Farben dargestellt. Blau: N-Terminus; grün: Protease; orange: PDZ1; rot: PDZ2. Die Nomenklatur der Elemente der Sekundärstruktur ist ebenfalls dargestellt (Krojer *et al.*, 2002)

B: Dargestellt ist die molekulare Oberfläche des DegP-Trimers. Die Domänen sind in verschiedenen Farben dargestellt. Protease: grün; PDZ1: gelb; PDZ2: orange. Die katalytischen Zentren sind in blau dargestellt (Clausen *et al.*, 2002).

Neben der trimeren Struktur konnten drei weitere oligomere Zustände von DegP identifiziert werden, wobei es sich dabei um das Hexamer, das Dodecamer und das 24mer handelt.

Das Hexamer besteht aus zwei übereinander gestapelten Trimeren und bildet so einen molekularen Käfig mit den Proteasedomänen als Boden und Deckel sowie den PDZ-Domänen als Seitenwänden (Krojer *et al.*, 2002). Abb. 2-9 zeigt die Kristallstruktur des Hexamers, wobei zwei verschiedene Zustände identifiziert werden konnten. Es handelt sich

dabei um die so genannte offene und die so genannte geschlossene Konformation. Während der Zugang zum Inneren des Moleküls in der geschlossenen Konformation vollständig blockiert ist, verändert sich die Lage der PDZ-Domänen des Moleküls in der offenen Konformation so, dass ein lateraler Zugang zum Inneren des Moleküls entsteht.

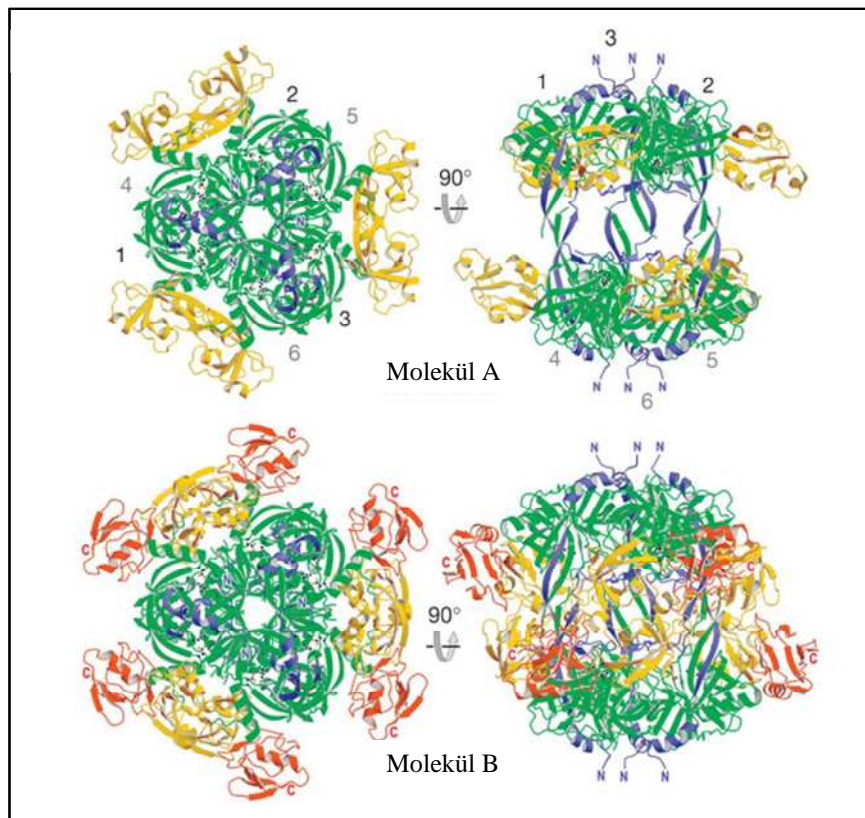


Abb. 2-9: Hexamere Struktur von DegP (Krojer *et al.*, 2002)

Dargestellt ist die hexamere Struktur von DegP als Auf- und Seitenansicht. Bei Molekül A handelt es sich um die offene Konformation, bei Molekül B um die geschlossene Konformation. Beide Moleküle haben dieselbe Höhe von etwa 105 Å und einen Durchmesser von 120 Å. Die Nomenklatur der Monomere ist gegeben. Die Domänen sind in verschiedenen Farben dargestellt. Blau: N-Terminus; grün: Protease; orange: PDZ1; rot: PDZ2.

Während die Struktur der PDZ1-Domäne in beiden Konformationen aufgeklärt werden konnte, wurde die Struktur der PDZ2-Domäne aufgrund der hohen Flexibilität nur in der geschlossenen Konformation entschlüsselt. Die unterschiedliche Anordnung der PDZ1-Domäne in beiden Konformation ist deutlich zu erkennen und zeigt, dass die hohe Flexibilität der PDZ-Domänen von großer mechanistischer Bedeutung für DegP ist. Zur Stabilität des Hexamers tragen die Loops LA, L1 und L2 bei. Dabei ragt Loop LA, der sich am N-Terminus des Proteins befindet, in das aktive Zentrum eines gegenüberliegenden Monomers hinein und interagiert dort mit den Loops L1 und L2. Diese stabilisierende Loop-Triade blockiert sowohl das aktive Zentrum als auch die korrekte Ausrichtung der S1 Bindetasche des Oligomers.

Sowohl Kolmar *et al.* als auch Kim *et al.* postulierten, dass DegP neben der hexameren Struktur eine dodecamere Struktur ausbilden kann, die aus zwei übereinander liegenden Hexameren besteht (Kolmar *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1999). In neueren Arbeiten von Krojer *et al.* konnte die Existenz des DegP 12mers und des 24mers bestätigt und die Kristallstruktur des 24mers gelöst werden (siehe Abb. 2-10) (Krojer *et al.*, 2008a). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die höheren Oligomere eine erhöhte proteolytische Aktivität aufweisen (siehe 2.5.3; Krojer *et al.*, 2008a; Jiang *et al.*, 2008). Außerdem wurde vorgeschlagen, dass die Bindung von DegP an Lipidmembranen die Assemblierung zu höheren Oligomeren unabhängig von der Substratbindung initiiert (Shen *et al.*, 2009).

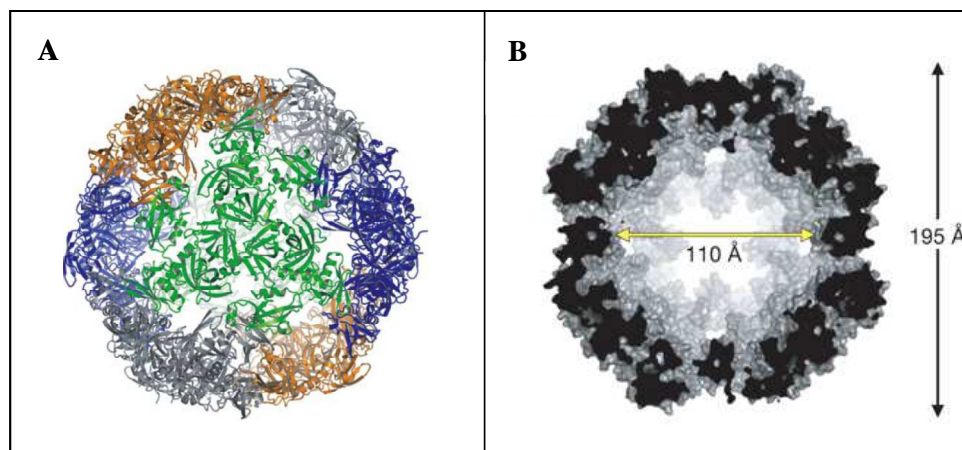


Abb. 2-10: Struktur des DegP 24mer (Krojer *et al.*, 2008a)

A: Dargestellt ist die Kristallstruktur des DegP 24mer. Die Trimere sind in verschiedenen Farben dargestellt.

B: Dargestellt ist der Querschnitt des DegP 24mers. Die Schnittstelle ist dabei dunkelgrau markiert. Der Durchmesser des Partikels beträgt 110 Å; die Höhe 195 Å.

Auch im 24mer bildet das Trimer die Grundeinheit des Komplexes. Dabei bilden acht Trimere einen Käfig mit einer Höhe von 195 Å, einem Durchmesser von 110 Å und einer Wanddicke von 31 Å. Es existieren verschieden große Poren (Durchmesser: 14 Å bis 35 Å), die den Zugang zum Innenraum und somit zum aktiven Zentrum ermöglichen. Aufgrund der Porengröße können nur Proteine bis zu einer bestimmten Größe in das Innere gelangen, die folglich mindestens partiell ungefalted sein müssen. Der Innenraum des 24mers birgt Platz für Proteine bis zu einer Größe von 300 kDa.

Die Assemblierung zum 24mer führt zu der Auflösung einer im Hexamer bestehenden Loop-Triade, so dass ein funktionelles proteolytisches Zentrum ausgebildet werden kann.

2.5.3 Die Doppelfunktion von DegP als Protease und Chaperon

Das periplasmatische DegP zeichnet sich durch seine Doppelfunktion als Protease und Chaperon aus und spielt eine zentrale Rolle in der bakteriellen Proteinqualitätskontrolle (Spiess *et al.*, 1999). Dabei weist es bei höheren Temperaturen (37-45°C) die für Hitzeschockproteine typische erhöhte Proteaseaktivität auf und eliminiert ungefaltete und fehlgefaltete Proteine (Strauch *et al.*, 1989). Im Gegensatz zu anderen Hitzeschockproteinen ist DegP in seiner proteolytischen Aktivität ATP-unabhängig, was aufgrund des Fehlens von ATP im Periplasma essentiell ist (Swamy *et al.*, 1983). Bekannte DegP-Substrate sind fehlgefaltete periplasmatische Proteine wie MBP (Betton *et al.*, 1998), PhoA (Sone *et al.*, 1997) und MalS (Spiess *et al.*, 1999) sowie falsch lokalisierte Proteine wie TreF (Uhland *et al.*, 2000) und OmpF (Misra *et al.*, 2000). Auch unstrukturierte Proteine wie Casein und Hitze-denaturierte Proteine wie Citratsynthase und Malatdehydrogenase können von DegP hydrolysiert werden (Kim *et al.*, 1999). Native stabil gefaltete Proteine wie BSA und Insulin dienen hingegen nicht als Substrate für DegP (Kim *et al.*, 1999; Swamy *et al.*, 1983). Erste para-Nitroanilin basierte Substrate, die zum quantitativen Nachweis der Proteaseaktivität von DegP dienen, konnten kürzlich entwickelt werden (Meltzer, 2008; Hauske *et al.*, 2009).

Bindungsstudien haben gezeigt, dass DegP mit erhöhter Wahrscheinlichkeit nach den Aminosäuren Valin, Alanin, Threonin und Isoleucin hydrolysiert und somit eine Präferenz für hydrophobe Aminosäuren an der Position P₁ aufweist (Kolmar *et al.*, 1996; Krojer *et al.*, 2008b). Während die proteolytische Aktivität unspezifisch durch Diisopropylfluorophosphat (DFP), einen allgemeinen Serinproteaseinhibitor, inhibiert werden kann, inhibieren andere Serinproteaseinhibitoren wie Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) nicht (Lipinska *et al.*, 1990).

Neue Studien stellen das Modell der Prozessivität für DegP auf (Krojer *et al.*, 2008b). In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass Substrate prozessiv hydrolysiert werden, indem die PDZ1- und Proteasedomänen eines Trimers miteinander kooperieren (siehe Abb. 2-11).

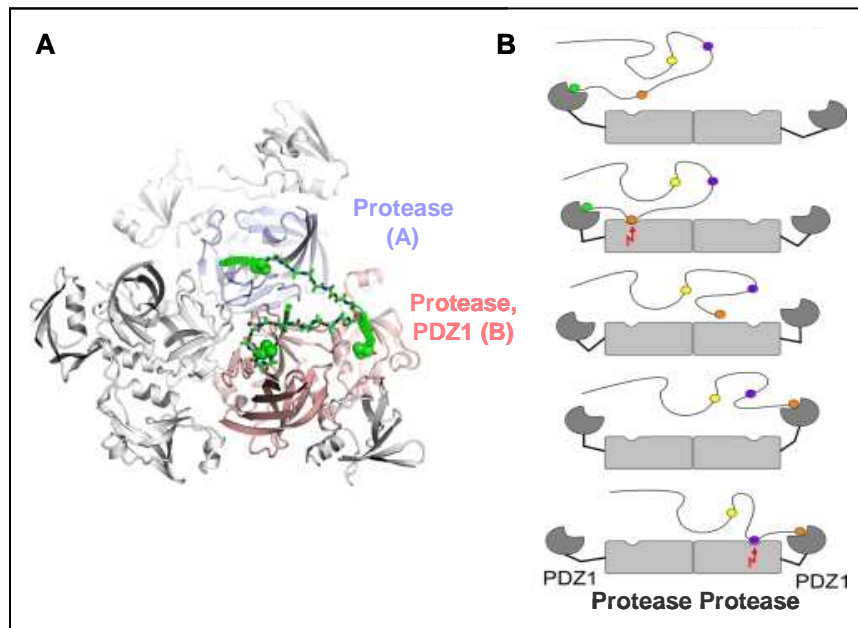


Abb. 2-11: Prozessive Hydrolyse von Substraten durch DegP (Krojer *et al.*, 2008b, modifiziert)

A: Kooperation zwischen PDZ1-Domäne und proteolytischem Zentrum. Dargestellt ist das DegP-Trimer mit zwei modellierten Peptidliganden (grün), die an die aktiven Zentren binden. Die Proteasedomäne und PDZ1-Domäne einer Untereinheit sind in rot, die Proteaseeinheit der anderen Untereinheit in blau dargestellt. Der Abstand zwischen den Domänen bestimmt die Länge des Peptidliganden bzw. der durch DegP hydrolysierten Fragmente.

B: Dargestellt ist ein Modell der prozessiven Hydrolyse eines Substrats. Gezeigt ist die schematische Seitenansicht auf ein DegP-Trimer, so dass zwei Untereinheiten zu sehen sind (Protease: hellgrau; PDZ-Domäne: dunkelgrau). Das Substrat mit den potentiellen Schnittstellen (farbige Kugeln) wird zuerst von einer Untereinheit gebunden und hydrolysiert. Aufgrund der ähnlichen Substratspezifität des proteolytischen Zentrums und der PDZ1-Domäne erzeugt der Schnitt ein neues Substrat, das wiederum von einer in der Nähe befindenden PDZ1-Domäne fixiert und einer Proteasedomäne präsentiert werden kann.

Die PDZ1-Domäne eines Monomers fixiert dabei den C-Terminus des Substrates und präsentiert es der Proteasedomäne, so dass die Hydrolyse erfolgen kann. Aufgrund der vermuteten ähnlichen Substratspezifität des proteolytischen Zentrums und der PDZ1-Domäne erzeugt der Schnitt ein neues Substrat, das wiederum von einer PDZ1-Domäne fixiert und einer Proteasedomäne präsentiert werden kann. Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Prozesses entstehen letztendlich Oligopeptide, die eine ähnliche Länge aufweisen.

Ursprünglich wurde beschrieben, dass DegP temperaturabhängig aktiviert wird, wobei die Proteasefunktion bei höheren Temperaturen überwiegt (Spiess *et al.*, 1999). Neuere Studien zeigen darüber hinaus, dass DegP einem allosterischen Aktivierungsmechanismus unterliegt, der die temperaturabhängige Aktivierung dominiert (Krojer *et al.*, 2008a, Krojer *et al.*, 2008b; Meltzer, 2008). Die Inkubation mit fehlgefalteten Proteinen wie MalS oder OmpC aktiviert dabei die Proteaseaktivität schon bei niedrigen Temperaturen. Diese Aktivierung geht einher mit einer Verschiebung des oligomeren Zustandes vom Hexamer zum 12mer und 24mer.

Dabei weisen das 24mer und das 12mer eine höhere proteolytische Aktivität auf als das Hexamer (Krojer *et al.*, 2008a; Jiang *et al.*, 2008).

Neben der substratabhängigen Aktivierung wurde kürzlich ebenfalls ein substratunabhängiger Mechanismus beschrieben, bei dem die Bindung von DegP an Lipidmembranen zu der Ausbildung höherer Oligomere führt. Das an Liposomen gebundene DegP weist dabei eine höhere proteolytische Aktivität auf als ungebundenes DegP (Shen *et al.*, 2009).

Einhergehend mit der Aufdeckung des allosterischen Aktivierungsmechanismus und der Aufklärung der Kristallstruktur des 24mer zeigten Krojer *et al.*, dass Chaperon- und Proteaseaktivität im gleichen Molekül auftreten können (Krojer *et al.*, 2008a). Es wurde beschrieben, dass das 24mer korrekt gefaltete Omp-Monomere stabil bindet und umschließt. Als Chaperon vermittelt DegP so das Rückfalten oder Einkapseln von falsch gefalteten Proteinen und verhindert auf diese Weise die Bildung von Proteinaggregaten (Spiess *et al.*, 1999; Skorko-Glonek *et al.*, 2007). Auch in früheren Studien konnte die Chaperonaktivität von DegP bereits nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde *in vitro* eine erhöhte Rückfaltung der chemisch denaturierten Proteine MalS und Citratsynthase in Gegenwart von DegP gezeigt. *In vivo* wurde belegt, dass sowohl die *degP* Deletionsmutante als auch der lethale Phänotyp der Doppeldeletionsmutante *degP surA* durch die Expression der proteolytisch inaktiven Form von DegP komplementiert wird (Spiess *et al.*, 1999; Rizzitello *et al.*, 2001). Weitere Studien zeigten *in vivo*, dass der lethale Phänotyp von Omp-Mutanten im *degP*⁻-Hintergrund durch die Expression der proteolytisch inaktiven Form von DegP komplementiert wird (Misra *et al.*, 2000; CastilloKeller und Misra, 2003).

Eine weitere postulierte DegP-Funktion ist die einer Makropore zwischen cytoplasmatischer und periplasmatischer Membran, die die Diffusion von Omp-Monomeren durch sie hindurch ermöglicht. Unterstützt wird diese Hypothese durch die bereits beschriebene hohe Affinität des DegP 24mer zu Liposomen, die der von anderen Membran assoziierten PDZ-Proteinen ähnelt (Wu *et al.*, 2007a; Krojer *et al.*, 2008a), sowie durch die Tatsache, dass die Größe des DegP Multimers in etwa der Distanz zwischen Innen- und Außenmembran (150-330Å) entspricht (Dubochet *et al.*, 1983; Leduc *et al.*, 1985; Krojer *et al.*, 2008a).

2.6 PDZ-Domänen

PDZ-Domänen sind globuläre Protein-Interaktionsmodule, die an vielen zellulären Funktionen beteiligt sind und dort eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion einnehmen (van Ham und Hendriks, 2003; Jelén *et al.*, 2003; Jemth und Gianni, 2007). Ursprünglich wurden PDZ-Domänen in drei Proteinen identifiziert, die den Modulen auch ihren heutigen

Namen gaben. Dabei handelt es sich um das *postsynaptic density protein* **P**SD-95/SAP90 (Tsunoda *et al.*, 1998), das *Drosophila septate junction protein* **D**iscs-large und das *epithelial tight junction protein* **Z**O-1 (Kennedy, 1995). Ebenfalls bekannt sind PDZ-Domänen als Discs-large Homologieregionen (DHRs) oder GLGFs, was sich auf ein in ihnen vorkommendes hoch konserviertes Motiv bezieht. PDZ-Domänen sind 80 bis 100 Aminosäuren lang und binden meist C-Termini von anderen Proteinen wie Transmembranrezeptoren und Kanalproteinen oder von anderen PDZ-Domänen (Kornau *et al.*, 1995). So unterstützen sie die Bildung supramolekularer Komplexe und dirigieren Proteine zu ihrem Zielort. In ihrer Funktion als Protein-Protein-Interaktionsmodule sind sie häufig membranassoziiert, da sie dort eine Rolle in der Signaltransduktion, im Ionentransport und in der Ausbildung von *tight junctions* spielen (Fanning und Anderson, 1999). Während PDZ tragende Proteine häufig ein bis drei PDZ-Domänen besitzen, gibt es auch Proteine, die wesentlich mehr PDZ-Domänen aufweisen. So besitzt das Protein MUPP1 13 PDZ-Domänen und ist so in der Lage, viele Proteine zu einem großen Komplex zusammenzuführen (Schultz *et al.*, 1998; Schultz *et al.*, 2000).

Während PDZ-Domänen in Metazoen weit verbreitet sind, konnten bisher nur einige PDZ-Domänen in *E. coli* und *S. cerevisiae* beschrieben werden (Schultz *et al.*, 1998; Schultz *et al.*, 2000). Dies lässt sich aus der Funktion der Module ableiten, die hauptsächlich für Zell-Zell-Kontakte in mehrzelligen Organismen wichtig ist. So konnten bis heute bereits über 1000 PDZ-Domänen in weit über 400 Proteinen im Menschen identifiziert werden.

Trotz großer Unterschiede in der Primärstruktur verschiedener PDZ-Domänen weist die Tertiärstruktur einen meist ähnlichen Aufbau auf. Dabei bilden sechs β -Faltblattstränge (β A- β F) und zwei α -Helices (α A, α B) ein sechssträngiges β -Sandwich. Der N- und C-Terminus der Domäne liegen dicht beieinander und erleichtern so die Eingliederung in verschiedene Multidomänenproteine (Harris und Lim, 2001). Der C-Terminus eines Liganden bindet meist in einer Furche zwischen β B und α B, bildet einen zusätzlichen antiparallelen β -Strang und verändert die Struktur der PDZ-Domäne nicht wesentlich (Harrison, 1996). Abb. 2-12 zeigt die Struktur der PDZ3-Domäne von PSD95, bei der es sich um eine der am besten untersuchten PDZ-Domänen handelt. Neben den für die PDZ-Domänen typischen Strukturelementen ist die Bindung eines Liganden (NH₂-KQTSV-COOH) in verschiedener Ausrichtung und Darstellung zu sehen. Dabei sind ebenfalls die für die Bindung des Liganden notwendigen Bindetaschen, die den C-Terminus sowie den P₀ und den P₋₂ Aminosäurerest binden, dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass PDZ-Domänen Liganden favorisieren, die ein Valin, Isoleucin oder Leucin am C-Terminus besitzen (Doyle *et al.*, 1996). Auch die

Position des GLGF-Motivs ist in Abb. 2-12 dargestellt. Es handelt sich dabei um einen hochkonservierten Carboxylatbindeloop zwischen den Strängen β A und β B.

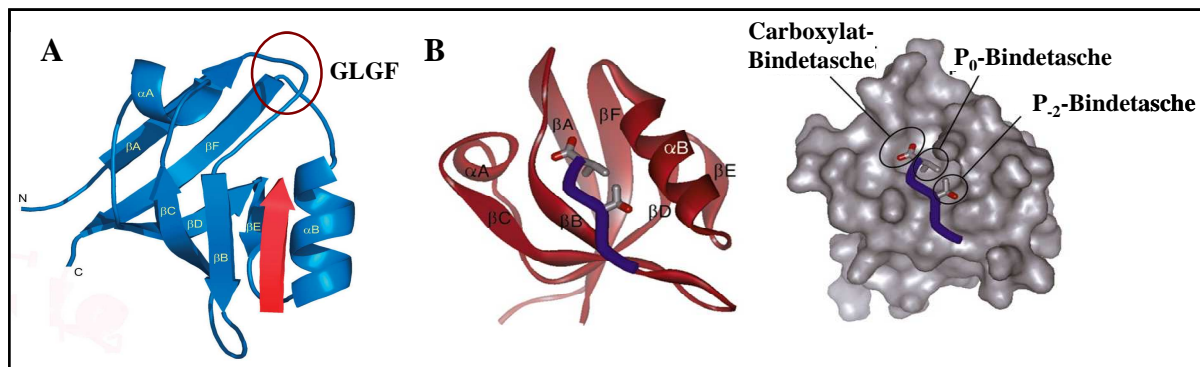


Abb. 2-12: Struktur der PDZ3 von PSD-95 und Peptidbindung

A: Dargestellt ist die PDZ-Domäne 3 von PSD-95 (blau) mit dem Peptid $\text{NH}_2\text{-KQTSV-COOH}$ (rot). Die Nomenklatur der Sekundärstrukturelemente ist angegeben. Der Ligand bildet einen zusätzlichen β -Strang. Das GLGF-Motiv ist rot markiert (Jelén *et al.*, 2003).

B: Gezeigt ist die PDZ-Domäne 3 von PSD-95 (rot) mit dem Peptid $\text{NH}_2\text{-KQTSV-COOH}$ (blau) in zwei verschiedenen Darstellungen. Dabei ist der Carboxylatbindeloop, die P_0 -Bindetasche sowie die P_2 -Bindetasche dargestellt (Harris und Lim, 2001)

Neben den C-Termini können PDZ-Domänen auch interne Peptidsequenzen der Liganden binden, die in ihrer tertiären Struktur einen C-Terminus imitieren (Gee *et al.*, 1998). Eines der in diesem Zusammenhang am besten charakterisierten Beispiele ist die Bindung der α Syntrophin PDZ-Domäne an die nNOS PDZ-Domäne. Wie Abb. 2-13 zeigt, bindet die PDZ-Domäne von α Syntrophin dabei ein internes Bindemotiv der nNOS PDZ-Domäne (Christopherson *et al.*, 1999). Dabei imitiert die nNOS PDZ-Domäne einen C-Terminus, indem sie eine verlängerten β -Haarnadelschleife, den β -Finger, bildet. Dimerisierungen dieser Art konnten bereits zwischen verschiedenen PDZ-Domänen beobachtet werden (Marfatia *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Utepbergenov *et al.*, 2006; Fanning *et al.*, 2007). Auch PDZ-Domänen eines Proteins können auf diese Weise miteinander interagieren (Fouassier *et al.*, 2000; Lau und Hall, 2001). Xu *et al.* zeigten zum Beispiel, dass die PDZ-Domänen 3 und 4 des Proteins INAD aus *Drosophila* miteinander dimerisieren (Xu *et al.*, 1998).

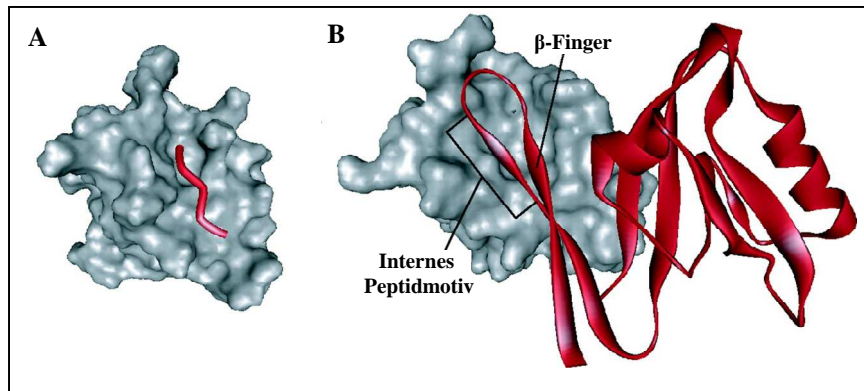


Abb. 2-13: Die Bindung interner Peptidmotive an PDZ-Domänen (Harris und Lim, 2001)

A: Dargestellt ist die Bindung des Liganden $\text{NH}_2\text{-VKESLV-COOH}$ (rot) an die $\alpha 1$ -Syntrophin PDZ-Domäne (grau) (Schultz *et al.*, 1998).

B: Dargestellt ist die Bindung der nNOS PDZ-Domäne (rot) an die $\alpha 1$ -Syntrophin PDZ-Domäne (Hillier *et al.*, 1999). Dabei imitiert die nNOS PDZ-Domäne einen C-Terminus, in dem sie einen β -Finger ausbildet.

Anhand der Konsensussequenz des Liganden können PDZ-Domänen in drei Klassen eingeteilt werden (Jelén *et al.*, 2003). Die entsprechenden Konsensussequenzen sowie einige Beispiele sind in Tab. 2-1 dargestellt.

Tab. 2-1: Klassifizierung von PDZ-Domänen anhand der Konsensussequenz des Liganden

Klasse/ Konsensussequenz des Liganden	Beispiele/ PDZ-Proteine	Referenz
Klasse I: -X-[S/T]-X- ϕ	PSD-95, Dlg, ZO-1	Songyang <i>et al.</i> , 1997; Doyle <i>et al.</i> , 1996
Klasse II: -X- ϕ -X- ϕ	CASK, Erbin	Songyang <i>et al.</i> , 1997
Klasse III: -X-[D/E/K/R]-X- ϕ	nNOS	Strickner <i>et al.</i> , 1997; Tochio <i>et al.</i> , 1999
Andere: -X- ψ -[D/E]-XXC	SITAC	Schneider <i>et al.</i> , 1999

ϕ : hydrophobe Aminosäurereste wie V,I,L,A,G,W,C,M,F; X: unspezifisch;

ψ basisch hydrophile Aminosäurereste wie H,R,K

Eine andere Möglichkeit zur Klassifizierung bietet die Einteilung nach strukturellen und funktionellen Merkmalen der PDZ-Proteine. Dabei wird zwischen PDZ-Proteinen ohne enzymatische Aktivität, die wiederum in zwei Unterklassen eingeteilt werden können, PDZ-Proteinen mit enzymatischer Aktivität und nicht konventionellen PDZ-Proteinen unterschieden (Ponting, 1997; Fan und Zhang, 2002). Die PDZ-Domänen der dritten Klasse liegen häufig in Koexistenz mit einer Proteasedomäne vor. Dabei kann es sich um C-terminale, N-terminale oder interne PDZ-Domänen handeln. Während DegP zwei C-terminale PDZ-Domänen

besitzt, handelt es sich bei den Proteasen RseP und Tsp um Proteasen mit zwei bzw. einer internen PDZ-Domäne (Beebe *et al.*, 2000; Spiers *et al.*, 2002; Clausen *et al.*, 2002; Krojer *et al.*, 2002; Inaba *et al.*, 2008). Beispiele zu den drei Klassen sowie deren schematischer Aufbau sind in Abb. 2-14 dargestellt.

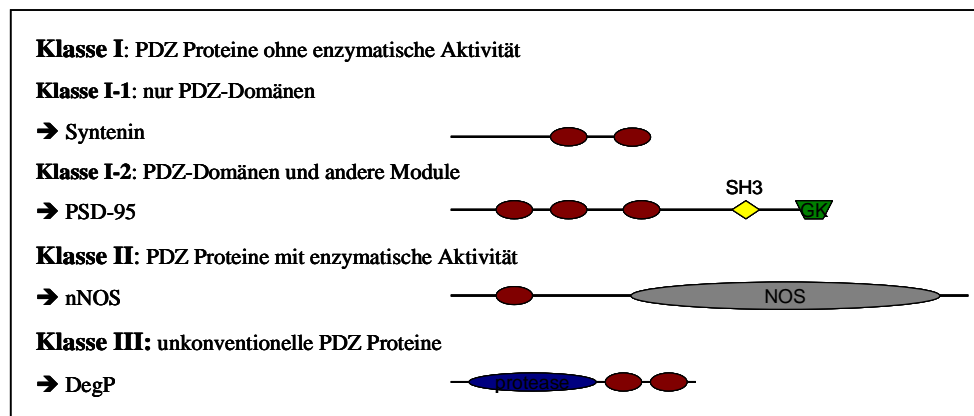


Abb. 2-14: Klassifizierung der PDZ-Proteine nach Struktur und Funktion

Gezeigt ist die Klassifizierung der PDZ-Proteine nach strukturellen und funktionellen Eigenschaften. Eine schematische Darstellung eines jeweiligen Beispiels ist ebenfalls abgebildet. Dabei sind die PDZ-Domänen als rote runde Module dargestellt. SH3= Src Homologie 3 Domäne; GK= Guanylat-Kinase-ähnliche Domäne; NOS= nitric oxide synthase; protease= Proteasedomäne (Quelle: Fan und Zhang, 2002, modifiziert).

2.6.1 Die Rolle von PDZ-Domänen in HtrA-Proteasen

Das charakteristische Merkmal von HtrA-Proteasen ist die Kombination einer Proteasedomäne mit ein bis zwei PDZ-Domänen (siehe Abb. 2-4; 2.4). Bisher konnten einige Erkenntnisse über die PDZ-Domänen von HtrA-Proteasen gewonnen werden, wobei Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede im Vergleich zu den klassischen PDZ-Domänen (siehe 2.6) festzustellen sind.

Die HtrA-Protease HtrA2 (Omi) ist eine trimere mitochondriale Serinprotease (Suzuki *et al.*, 2001; Verhagen *et al.*, 2002; van Loo *et al.*, 2002). Sie besitzt eine PDZ-Domäne, die trotz ähnlichem Aufbau im Vergleich zu den klassischen PDZ-Domänen zirkulär permutiert ist (siehe Abb. 2-15). Dabei entspricht der N-terminale Faltblattstrang $\beta 1$ der klassischen PDZ-Domänen dem C-terminalen Strang $\beta 5$ der HtrA2-PDZ (Li *et al.*, 2002). Des Weiteren besitzt HtrA2-PDZ eine zusätzliche α -Helix ($\alpha 1$), die klassische PDZ-Domänen nicht besitzen (Zhang *et al.*, 2007). Li *et al.* postulierten, dass die PDZ-Domäne unter stressfreien Bedingungen das aktive Zentrum des Proteins blockiert (Li *et al.*, 2002). Sie zeigten in ihrer Kristallstruktur, dass die PDZ-Domäne zum einen über einen flexiblen Linker an die

Proteasedomäne gebunden ist, zum anderen eng an die Proteasedomäne anliegt. Dabei wurden bestehende van der Waals Wechselwirkungen zwischen den Strängen $\beta 11$ und $\beta 12$ der Proteasedomäne und $\alpha 5$ und $\beta 14$ der PDZ-Domäne gezeigt. Die Vermutung, dass die PDZ-Domäne die Proteaseaktivität inhibiert, wurde durch die Charakterisierung der PDZ-Deletionsmutante gestärkt, die eine erhöhte Proteaseaktivität als der Wildtyp aufweist (Martins *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2004).

Zhang *et al.* stellten die These auf, dass sich die PDZ-Bindetasche zwischen den Strängen $\beta 1$ und $\alpha 3$, die äquivalent sind zu den Bereichen $\beta 2$ und $\alpha 2$ klassischer Serinproteasen, befindet (Zhang *et al.*, 2007). Sie beschrieben, dass HtrA2-PDZ prinzipiell unstrukturierte hydrophobe Aminosäurebereiche über van der Waals Kräfte binden kann, wobei sowohl C-terminale als auch interne Aminosäurebereiche erkannt werden. Daher kann HtrA2-PDZ zu der Klasse II der PDZ-Domänen gezählt werden. Auch in anderen Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass HtrA2-PDZ meist hydrophobe Aminosäurereste bindet, wobei etwas voneinander abweichende Konsensussequenzen ermittelt wurden (Martins *et al.*, 2002; Junqueira *et al.*, 2003). Abb. 2-15 zeigt die Struktur von HtrA2-PDZ im Vergleich zu den klassischen PDZ-Domänen Erbin-PDZ und ZO1-PDZ1 (Zhang *et al.*, 2007). Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Struktur sind deutlich zu erkennen.

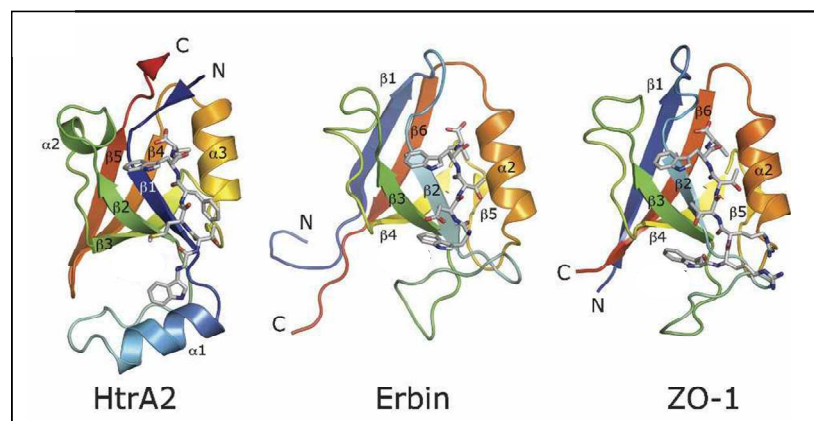


Abb. 2-15: Kristallstruktur von HtrA2-PDZ (Zhang *et al.*, 2007)

Dargestellt ist die Kristallstruktur von HtrA2-PDZ im Vergleich zu den Strukturen der PDZ-Domänen von Erbin und ZO-1. Die Nomenklatur der Sekundärstruktur ist aufgeführt. Gebundene Substrate sind ebenfalls eingezeichnet. HtrA2 ist im Vergleich zu den beiden anderen Strukturen zirkulär permutiert.

Eine ähnliche Funktion konnte auch für die PDZ-Domäne der bakteriellen HtrA-Protease DegS postuliert. Unter stressfreien Bedingungen inhibiert die PDZ-Domäne DegS in seiner Proteasefunktion, in dem sie Strukturen der Proteasedomäne im inaktiven Zustand fixiert. Bei Faltungsstress binden allosterische Aktivatoren an die PDZ-Domäne (Walsh *et al.*, 2003;

Wilken *et al.*, 2004; Sohn *et al.*, 2007, Hasselblatt *et al.*, 2007), was zu einer Umorientierung der PDZ-Domäne führt (siehe Abb. 2-1). Initiiert durch diesen Prozess finden Umstrukturierungen in der Proteasedomäne statt, die letztendlich dazu führen, dass DegS in seiner aktiven Form vorliegt. Wilken *et al.* zeigten außerdem, dass die Position P₋₁ des PDZ-Liganden zusätzlich an einen Loop (L3) der Proteasedomäne bindet (Wilken *et al.*, 2004).

Die PDZ-Domäne von DegS besteht aus sieben β -Faltblattstängen (β m- β s) sowie zwei α -Helices (α 5 und α 6). Der Strang β n, sein N-terminaler Loop (der so genannte Carboxylatbindeloop) und die Helix 6 bilden die Substratbindetasche. Dabei wird der Carboxylatbindeloop durch das Motiv YIGI gebildet, das homolog ist zu dem hoch konservierten GLGF Motiv klassischer PDZ-Domänen (siehe 2.6; Wilken *et al.*, 2004).

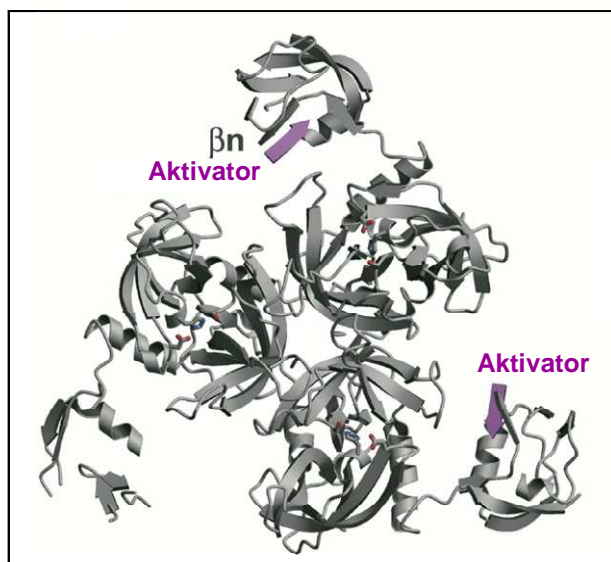


Abb. 2-16: Peptidbindung an die PDZ-Domäne von DegS (Wilken *et al.*, 2004)

Dargestellt ist die Bindung eines Aktivators (magenta) an das DegS-Trimer. Bei dem aktivierenden Peptid handelt es sich um den C-Terminus von OmpC, der an die PDZ-Domänen bindet. Dabei bildet der Aktivator einen additiven β -Faltblattstrang zu β n. In dieser Darstellung ist die Bindung an zwei der drei PDZ-Domänen gezeigt. Die aktiven Zentren von DegS sind in rot angedeutet.

Bei einer weiteren Protease der HtrA-Familie handelt es sich um HtrA1 (siehe 2.4). Über die Funktion und den Funktionsmechanismus der PDZ-Domäne ist bisher wenig bekannt. Runyon *et al.* postulierten, dass die HtrA1-PDZ ähnlich wie die HtrA2-PDZ C-terminale und interne hydrophobe Peptide bindet (Runyon *et al.*, 2007). Abb. 2-17 zeigt die Struktur von HtrA1-PDZ, gebunden an das Peptid DSRIWWV-COOH.

Während die beschriebenen Proteasen HtrA2, DegS und HtrA1 jeweils nur eine PDZ-Domäne besitzen, handelt es sich bei dem bakteriellen DegP um eine HtrA-Protease mit zwei PDZ-Domänen.

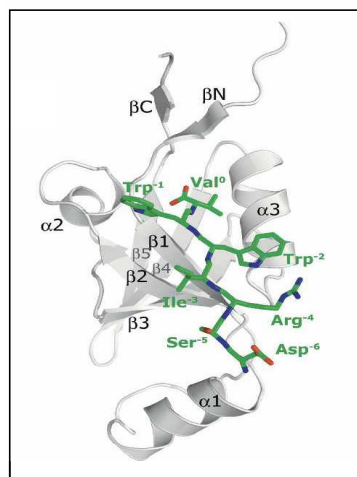


Abb. 2-17: Struktur von HtrA1-PDZ (Runyon *et al.*, 2007)

Dargestellt ist die Struktur der PDZ-Domäne von HtrA1 (grau) gebunden zum Peptid $\text{NH}_2\text{-DSRIWWV-COOH}$. Die Nomenklatur der Sekundärstrukturen ist ebenfalls dargestellt.

2.6.2 Die PDZ-Domänen von DegP

E. coli DegP besitzt neben der N-terminalen Proteasedomäne zwei C-terminale PDZ-Domänen (PDZ1: Aminosäuren 260-358; PDZ2: Aminosäuren 359-448). Die Verbindungen dieser drei Bereiche werden durch zwei flexible Loops (Aminosäuren 258-263 und 354-366) gebildet (Clausen *et al.*, 2002; Krojer *et al.*, 2002).

Die Struktur der DegP PDZ-Domänen ähnelt der Struktur klassischer PDZ-Domänen (siehe 2.6). Wie andere HtrA-PDZs sind sie allerdings zirkulär permutiert und weisen eine höhere Flexibilität auf (siehe 2.6.1). DegP-PDZ1 besitzt zudem die zusätzlichen Strukturen $\beta 13$ und αF (Krojer *et al.*, 2002). Der Substratbindebereich der PDZ1 besteht aus dem Strang $\beta 14$, seinem N-terminalen Loop und der Helix αH (siehe Abb. 2-18). Bei dem N-terminalen Loop von Strang $\beta 14$ handelt es sich dabei um den so genannten Carboxylatbindeloop, der das Bindemotiv ELGI, das dem Bindemotiv GLGF klassischer PDZ-Domänen ähnelt, enthält (Krojer *et al.*, 2002; Jelén *et al.*, 2003). Hydrophobe Aminosäurereste in der PDZ1 formen die Bindetaschen für die Positionen P_0 und P_{-2} des Substrats.

Die Substratbindetasche der PDZ2-Domäne wird in der geschlossenen Konformation des Hexamers blockiert (siehe Abb. 2-18). Dabei imitieren die Aminosäurereste 355 bis 369 des Loops zwischen der PDZ1 und der PDZ2 den C-Terminus eines potentiellen Substrats. Die Aminosäurereste 358-362 binden dabei antiparallel zum Strang $\beta 21$ und interagieren

zusätzlich mit der Helix αJ . Es wird vermutet, dass eine Umorientierung des Carboxylatbindeloops dazu führt, dass dieser für Substrate zugänglich wird.

Während der PDZ1-Domäne eine wesentliche Rolle in der Substratbindung und Aktivierung von DegP zugesprochen wird, wird vermutet, dass die PDZ2-Domäne vor allen Dingen wichtig ist für die Oligomerisierung von DegP (Spiess *et al.*, 1999; Sassoon *et al.*, 1999; Clausen *et al.*, 2002; Iwanczyk *et al.*, 2007).

Ein neu aufgestellte Modell der Prozessivität für DegP belegt eine erweiterte Funktion der PDZ1-Domäne (Krojer *et al.*, 2008b). In diesem Zusammenhang wird postuliert, dass Substrate prozessiv von DegP hydrolysiert werden indem die PDZ1- und die Proteasedomäne eines Trimers miteinander kooperieren (siehe 2.5.3).

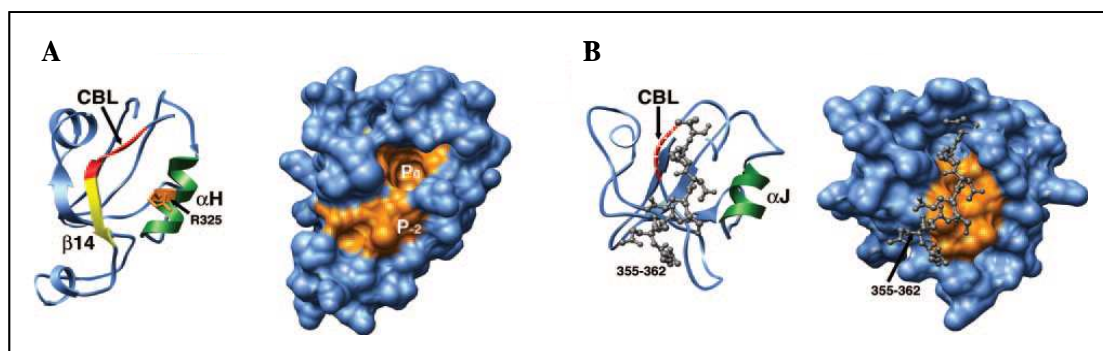


Abb. 2-18: Strukturen der PDZ-Domänen von DegP (Iwanczyk *et al.*, 2007)

A: Gezeigt ist die Struktur der PDZ1-Domäne von DegP in zwei verschiedenen Darstellungen. Hervorgehoben sind die für die Substratbindung relevanten Strukturen, unter anderem der Carboxylatbindeloop (CBL). Die hydrophoben Taschen der Bindetasche sind in der Oberflächendarstellung orange eingezeichnet.

B: Gezeigt ist die Struktur der PDZ2-Domäne von DegP in zwei verschiedenen Darstellungen. Hervorgehoben sind die für die Substratbindung relevanten Strukturen. Der Carboxylatbindeloop (CBL) konnte nicht in der Kristallstruktur der PDZ2-Domäne identifiziert werden, so dass er als gestrichelte Linie eingezeichnet ist. Die hydrophoben Taschen der Bindetasche sind in der Oberflächendarstellung orange eingezeichnet. Die Aminosäurereste 355 bis 358, die sich im Loop zwischen PDZ1 und PDZ2 befinden, füllen die Bindetasche der PDZ2-Domäne aus.

Anders als im Hexamer von DegP konnten im 24mer die Strukturen beider PDZ-Domänen aufgelöst werden (Krojer *et al.*, 2008a). Im 24mer stehen die PDZ-Domänen eines Trimers im engen Kontakt mit den PDZ-Domänen von zwei angrenzenden trimeren Ringen. Durch diese Interaktionen ordnen sich vier Trimere um eine vierfache Symmetrieachse an und formen so Poren, die aus einem Ring aus vier PDZ1/PDZ2*-Paaren (stammen von zwei benachbarten Molekülen) bestehen. Speziell die Rückseiten der PDZ-Domänen sind in dieser Anordnung größtenteils positiv geladen und stellen so potentielle Stellen für die Bindung an zelluläre Membranen dar (Krojer *et al.*, 2008a; Shen *et al.*, 2009). Während die Struktur der PDZ-

Domänen weitestgehend aufgeklärt ist, ist der Mechanismus der Substratbindung und Aktivierung von DegP über die PDZ-Domänen noch nicht vollständig geklärt.

2.7 Die allosterische Aktivierung der HtrA-Protease DegS

Bei der bakteriellen HtrA-Protease DegS handelt es sich um einen membrangebundenen Stresssensor der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle, der den Geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der σ^E -Signalkaskade katalysiert (siehe 2.5.1; Walsh *et al.*, 2003; Young und Hartl, 2003; Chaba *et al.*, 2007). Die Serinprotease besteht aus einer Proteasedomäne und einer C-terminalen PDZ-Domäne und liegt in der Zelle als Trimer vor (siehe 2.4). Ein besonderes Merkmal ist, dass die relative Orientierung der PDZ- und Proteasedomäne durch einen verlängerten C-Terminus, der zusätzliche Interaktionen zwischen diesen Domänen ermöglicht, stabilisiert wird. Die genaue Positionierung der PDZ-Domäne ist dabei entscheidend für die Regulation von DegS.

Unter stressfreien Bedingungen inhibiert die PDZ-Domäne DegS in seiner Proteasefunktion, in dem sie Strukturen der Proteasedomäne im inaktiven Zustand fixiert (Walsh *et al.*, 2003; Sohn *et al.*, 2007; Cezairliyan und Sauer, 2007). Dabei liegen die katalytische Triade, die Oxyaniontasche und spezifische Substratbindetaschen ungeordnet vor (Wilken *et al.*, 2004). Bei Faltungsstress binden C-Termini von falsch oder ungefalteten Außenmembranproteinen an die PDZ-Domäne und aktivieren DegS allosterisch (Walsh *et al.*, 2003; Wilken *et al.*, 2004; Sohn *et al.*, 2007, Hasselblatt *et al.*, 2007). Dabei führt die Bindung der Aktivatoren zu einer Umorientierung von Elementen der PDZ- und der Proteasedomäne. In mehreren Studien wurde beschrieben, dass es sich bei der C-terminalen Konsensussequenz der an DegS bindenden Peptide um das Motiv YXF handelt (Struyve *et al.*, 1991; Walsh *et al.*, 2003; Sohn *et al.*, 2007).

Die Cokristallisation von DegS mit aktivierenden Peptiden hat gezeigt, dass der gebundene Aktivator einen zusätzlichen β -Faltblattstrang zu den in der PDZ-Domäne von DegS vorkommenden β -Strängen ausbildet (Wilken *et al.*, 2004; Hasselblatt *et al.*, 2007). Dabei wird das konservierte Phenylalanin (Position 0) des Aktivators durch eine hydrophobe Tasche gebunden, die aus den Aminosäuren I259, T318, M319 und V322 besteht. Der Aminosäurerest -1 des Aktivators interagiert mit der Aminosäure T184 des Loops L3 der Proteasedomäne (siehe Abb. 2-19). Dies führt zu einer konformationellen Veränderung dieses Loops, was in einer Umorientierung der Loops L1, L2 und LD resultiert. Die Veränderungen führen dazu, dass die Substratbindetasche, die katalytische und die Aktivierungsdomäne funktionsfähig vorliegen (siehe Abb. 2-19).

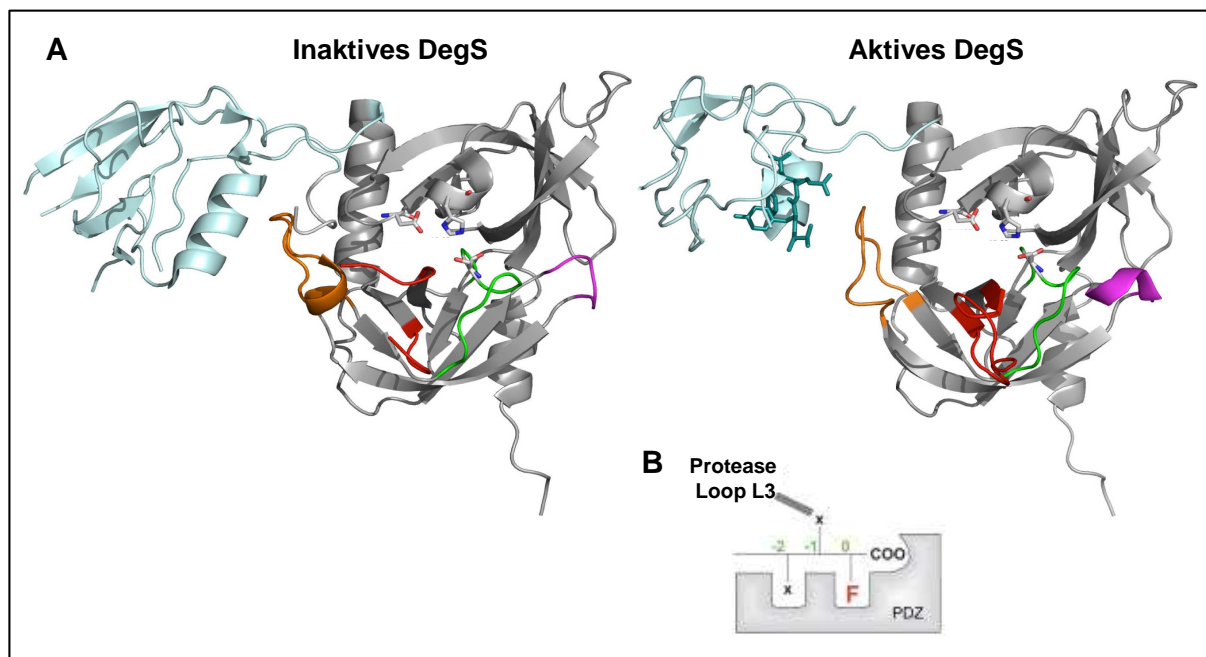


Abb. 2-19: Die allosterische Aktivierung von DegS

A: Dargestellt ist Vergleich zwischen inaktiver und aktiver Struktur des DegS-Monomer. In Abwesenheit von Faltungsstress liegt DegS in der inaktiven Konformation vor (links). Binden bei Faltungsstress C-Termini von falsch oder ungefalteten Außenmembranproteinen an die PDZ-Domäne von DegS, wird die Protease allosterisch aktiviert. Der allosterische Aktivator (blaugrün) bindet an die PDZ-Domäne (hellblau) und löst eine Konformationsänderung der Loops L 1-3 und LD aus. Dadurch bilden sich eine funktionsfähige Substratbindetasche, katalytische Domäne (farbig hervorgehoben) und Aktivierungsdomäne (rechts) aus. Die Proteasedomäne ist in grau, LD in magenta, L1 in grün, L2 in rot und L3 in orange dargestellt (Meltzer *et al.*, 2009).

B: Schematische Bindung des allosterischen Aktivators an DegS. Die Aminosäure an der Position 0, bei der es sich um ein Phenylalanin handelt sowie die Aminosäure an Position -2 binden an die PDZ-Domäne. Die Aminosäure an der Position -1 bindet an den Loop L3 der Proteasedomäne (Hasselblatt *et al.*, 2007).

Hasselblatt *et al.* identifizierten einzelne Aminosäuren, die sich im Zuge der allosterischen Aktivierung in DegS umorientieren und wichtig sind für die Proteaseaktivität (siehe Abb. 2-20; Hasselblatt *et al.*, 2007). Im inaktiven Zustand wird der Loop L3 von der PDZ-Domäne fixiert, so dass die Aminosäuren Q187 und D221 miteinander interagieren. Diese Interaktion unterbricht den hydrophoben Kern der Aktivierungsdomäne von DegS. Die Umorientierung des Loops L3 bei der Aktivierung unterbindet diese Interaktion, so dass sich eine funktionelle Aktivierungsdomäne über hydrophobe und polare Interaktionen (gebildet aus Y162 (LD), L164 (LD), I179 (L3), F220 (L2) und I232 (L2)) gebildet wird. Bei der Umorientierung des Loops L3 spielt die Aminosäure R178 eine entscheidende Rolle, da sie im inaktiven Zustand direkt mit der PDZ-Domäne, im aktiven Zustand direkt mit der Aktivierungsdomäne (über Q166 und L164) interagiert. Die Aminosäure Y162 ist im aktiven Zustand frei um Interaktionen mit der Aminosäure H198 einzugehen. Ausgehend von diesen Interaktionen

finden weitere Umorientierungen statt, die in einer funktionellen Oxyaniontasche und katalytischen Triade (S201/H96/D126) resultieren (siehe Abb. 2-20).

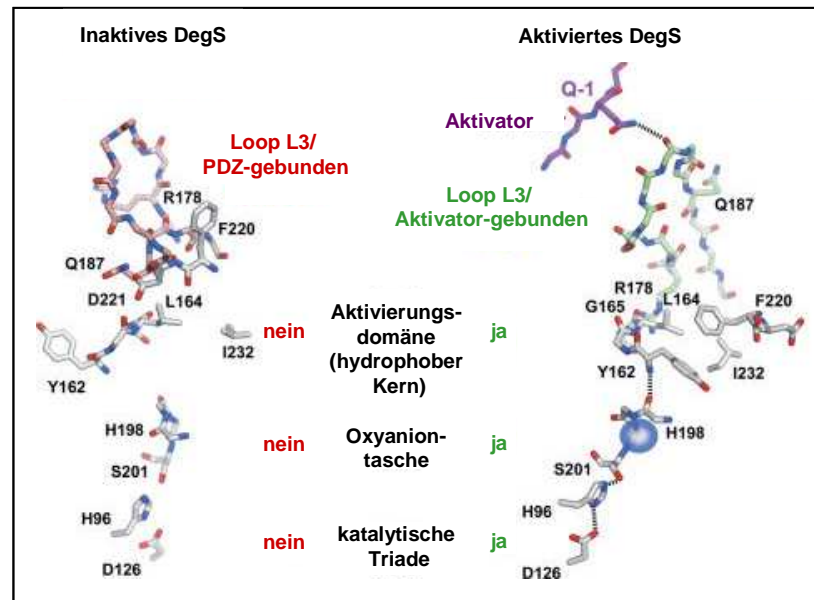


Abb. 2-20: Übergang vom inaktiven zum aktiven DegS (Hasselblatt *et al.*, 2007, modifiziert)

Dargestellt ist das Modell der allosterischen Aktivierung von DegS. Die für die Aktivierung wichtigen Aminosäuren von DegS sind hervorgehoben. Im inaktiven Zustand ist Loop L3 rot dargestellt. Im aktiven Zustand ist Loop L3 in grün zu sehen. Die Bindung des allosterischen Aktivators führt zu der Umorientierung der PDZ- und Proteasedomäne. Im aktiven Zustand sind Aktivierungsdomäne, Oxyaniontasche, und katalytische Triade korrekt ausgebildet.

Der allosterische Aktivierungsmechanismus von DegS weist Ähnlichkeiten zu dem Mechanismus der klassischen Trypsinaktivierung auf. Auch die Aktivierung von Trypsin findet durch die Umorientierung der Aktivierungsdomäne statt, die durch die Loops L1, L2 und LD gebildet wird (Huber und Bode, 1978; Zeth, 2004). Sowohl die Aktivierungsdomäne von DegS als auch die von Trypsin liegen im inaktiven Zustand eher flexibel, in der aktiven Struktur strukturell definiert vor.

Im Gegensatz zu der Trypsinaktivierung ist die allosterische DegS-Aktivierung allerdings reversibel, was eine schnelle flexible Zellantwort bei Faltungsstress erlaubt.

2.8 Zielsetzung der Arbeit

Das Hitzeschockprotein DegP ist ein entscheidender Faktor in der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle von *E. coli*. Es besitzt eine Doppelfunktion als Protease und Chaperon und kann in seiner Proteaseaktivität allosterisch aktiviert werden (Spiess *et al.*, 1999; Meltzer, 2008; Krojer *et al.*, 2008a, Krojer *et al.*, 2008b). Die allosterische Aktivierung ist reversibel und geht einher mit einer Veränderung des oligomeren Zustandes vom Hexamer zum 12mer und 24mer. Während die Strukturen der verschiedenen Oligomere von DegP aufgeklärt sind, ist der Mechanismus der Aktivierung und der Oligomerisierung von DegP bisher nicht vollständig entschlüsselt worden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, neue Einblicke in den Mechanismus der DegP-Aktivierung und Oligomerisierung zu gewinnen und die Rolle der verschiedenen DegP-Domänen in diesem Zusammenhang herauszuarbeiten. Ein besonderes Augenmerk soll dabei auf die PDZ-Domänen sowie auf die Loops L3 und L2 der Proteasedomäne gerichtet werden.

Im ersten Schritt sollen dazu Bindungsstudien mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie mit DegP und verschiedenen putativen Aktivatoren durchgeführt werden. Anschließend soll der Effekt dieser Aktivatoren auf den oligomeren Zustand von DegP untersucht werden. In Zusammenarbeit mit der Kooperationsgruppe an der Charité Berlin sollen außerdem neue Aktivatorepeptide über das Screening von Peptidbibliotheken identifiziert werden. Die Wirkung dieser neu identifizierten Peptide auf DegP soll mit Hilfe von Enzymtests, Bindungsstudien und Oligomerisierungsanalysen untersucht werden. In einem weiteren Schritt soll die Rolle der beiden PDZ-Domänen für die Aktivierung von DegP herausgearbeitet werden. Dazu sollen Bindungsstudien mit einzeln gereinigten PDZ-Domänen und DegP-Aktivatoren durchgeführt werden. Außerdem soll ermittelt werden, ob einzelne PDZ-Domänen PDZ-Deletionsmutanten in ihrer Funktion komplementieren. Die anschließende Charakterisierung von PDZ-Deletionsmutanten und PDZ1-Punktmutanten soll Aufschluss über die Rolle der PDZ-Domänen und einzelner Aminosäuren der PDZ1-Domäne für die Funktion und Regulation von DegP geben. Dazu sind Enzymtests mit und ohne Aktivatoren, massenspektrometrische Untersuchungen, Bindungsstudien, Oligomerisierungsanalysen und *in vivo* Komplementationstests geplant. Abschließend sollen Punktmutationen in die Loops L3 und L2 der Proteasedomäne eingeführt werden. Um die Rolle einzelner Aminosäuren dieser Elemente für die Funktion und Aktivierung von DegP aufzuklären, sollen diese Mutanten ebenfalls mit Hilfe der genannten Methoden charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeines

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen, soweit nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad „pro analysis“. Zum Ansetzen der Lösungen wurde hochreines Milli-Q-Wasser (Hausanlage mit nachgeschaltetem „water purification system EPA Esta. 41237-MA-1“, Millipore GmbH, Neu Isenberg) verwendet, nachfolgend als „A. dest.“ bezeichnet. Das A. dest. wurde regelmäßig im Bezug auf pH-Wert und Konduktivität überprüft.

3.2 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurde ausschließlich *Escherichia coli* verwendet. Die Charakteristika der entsprechenden Stämme sind in der Tab. 3-1 zusammengestellt.

Tab. 3-1: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	relevanter Genotyp	Herkunft
BL21 (DE3)	<i>F' ompT hsdSb (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)</i>	Novagen
CLC198	MC4100 <i>degP::tet</i>	Department of Molecular Biology, Princeton University, New Jersey, USA
DH5α	<i>F, supE44, ΔlacU169, [Φ80lacZΔM15], hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, (res⁻, mod⁺), deoR</i>	Hanahan, 1983
DHB4	MC1000 <i>ΔmalF3 ΔphoA (PvuII) phoR is araD139 Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 galE galK thi rps L F' lac'Q pro</i>	Boyd <i>et al.</i> , 1987
KU98	DHB4 <i>degP::kan treA::spec</i>	Laborsammlung
MA001	CLC198 <i>degP::tet ompC::kan</i>	Meltzer, 2008
MC4100	<i>F- araD139 Δ(araF-leu)U169 rpsL150 deoC1 relA1 ptsF25 flbB5301 rbsR</i>	Casadaban, 1976

3.3 Vektoren und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide mit ihren Charakteristika sind in der Tab. 3-2 zusammengefasst.

Tab. 3-2: Verwendete Vektoren und Plasmide

Vektor/Plasmid	Relevanter Genotyp	Resistenz	Herkunft
pAB22	pCS20 mit <i>degP</i> _{Δ189-195}	<i>amp</i>	Beil, 2002
pBR322	Klonierungsvektor, mit ColE1 Replikationsursprung	<i>amp</i>	Bolivar <i>et al.</i> , 1977

Vektor/Plasmid	Relevanter Genotyp	Resistenz	Herkunft
pCS19	Expressionsvektor, mit C-terminalem His-Tag und <i>lacI^q</i> -Gen	<i>amp</i>	Spiess, 1999
pCS20	pCS19 mit <i>degP</i>	<i>amp</i>	Spiess, 1999
pCS21	pCS19 mit <i>degP_{S210A}</i>	<i>amp</i>	Spiess, 1999
pDegPF240A	pCS20 mit <i>degP_{F240A}</i>	<i>amp</i>	Merdanovic, 2007
pDegPI228A	pCS20 mit <i>degP_{I228A}</i>	<i>amp</i>	Merdanovic, 2007
pDegPI236A	pCS20 mit <i>degP_{I236A}</i>	<i>amp</i>	Merdanovic, 2007
pDegPI238A	pCS20 mit <i>degP_{I238A}</i>	<i>amp</i>	Merdanovic, 2007
pDegPL229A	pCS20 mit <i>degP_{L229A}</i>	<i>amp</i>	Merdanovic, 2007
pDegPL229ASA	pCS20 mit <i>degP_{I229A, S210A}</i>	<i>amp</i>	Merdanovic, 2007
pDegS	pET21b mit DegSATM	<i>amp</i>	Beil, 2005
pET21d	Expressionsvektor, N-terminal T7-Tag, C-terminal His-Tag	<i>amp</i>	Novagen/Merck, Deutschland
pET26b	Expressionsvektor, N-terminal <i>pelB</i> Signal Sequenz, C-terminal His-Tag	<i>kan</i>	Novagen/Merck, Deutschland
pNK11	pET21d mit PDZ1 aus DegP	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNK12	pET21d mit PDZ2 aus DegP	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNK13	pET21d mit PDZ1+2 aus DegP	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNK14	pET21d mit PDZ aus DegS	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNK15	pCS20 mit <i>degP_{F321N, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNK16	pCS20 mit <i>degP_{L324N, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNK17	pCS20 mit <i>degP_{I267N, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNK18	pCS20 mit <i>degP_{L265N, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNK19	pCS20 mit <i>degP_{R262A, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNK20	pCS20 mit <i>degP_{V328S, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNK21	pET26b mit <i>degP_{APDZ2, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNK22	pET26b mit <i>degP_{APDZ2}</i>	<i>amp</i>	IMP Wien
pNK23	pCS20 mit <i>degP_{R262A, V328S}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNK24	pCS20 mit <i>degP_{R262A, V328S, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNK25	pCS20 mit <i>degP_{L265N}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM1	pCS20 mit <i>degP_{M268Q}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM10	pCS20 mit <i>degP_{F198A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM11	pCS20 mit <i>degP_{M268Q, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM12	pCS20 mit <i>degP_{R187A, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM13	pCS20 mit <i>degP_{S188A, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM14	pCS20 mit <i>degP_{G189A, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM15	pCS20 mit <i>degP_{L190A, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM16	pCS20 mit <i>degP_{N191A, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM17	pCS20 mit <i>degP_{E193A, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM18	pCS20 mit <i>degP_{E196A, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM19	pCS20 mit <i>degP_{N197A, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM2	pCS20 mit <i>degP_{R187A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM20	pCS20 mit <i>degP_{F198A, S210A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM3	pCS20 mit <i>degP_{S188A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM4	pCS20 mit <i>degP_{G189A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM5	pCS20 mit <i>degP_{L190A}</i>	<i>amp</i>	Diese Arbeit

Vektor/Plasmid	Relevanter Genotyp	Resistenz	Herkunft
pNM6	pCS20 mit <i>degP</i> _{N191A}	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM7	pCS20 mit <i>degP</i> _{E193A}	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM8	pCS20 mit <i>degP</i> _{E196A}	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pNM9	pCS20 mit <i>degP</i> _{N197A}	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pRS1	pCS20 mit <i>degP</i> _{ΔPDZ1+2}	<i>amp</i>	Soerensen, 2005
pSG39	pCS20 mit <i>degP</i> _{F321N}	<i>amp</i>	Grau, 2005
pSG40	pCS20 mit <i>degP</i> _{V328S}	<i>amp</i>	Grau, 2005
pSG41	pCS20 mit <i>degP</i> _{L265N}	<i>amp</i>	Diese Arbeit
pSG42	pCS20 mit <i>degP</i> _{L324N}	<i>amp</i>	Grau, 2005
pXC2	pCS20 mit <i>degP</i> _{R262A}	<i>amp</i>	Cai, 2007
pXC3	pCS20 mit <i>degP</i> _{I267N}	<i>amp</i>	Cai, 2007

3.4 Oligonukleotide

Als Startermoleküle für die PCR (siehe 3.14.6) wurden die in der Tab. 3-3 aufgeführten Oligonukleotide verwendet, die von der Firma Sigma-Aldrich bezogen wurden.

Tab. 3-3: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Nucleotidsequenz (5' → 3')	Schnittstelle
csDegPNcoI	tcccatggcgaaaaccacattagcac	<i>NcoI</i>
DegP PDZ1up	taaccatgggccaggtgaaacgcggtgag	<i>NcoI</i>
DegP PDZ2low	aatgaagcttctgcattaacaggtagatggtgc	<i>HindIII</i>
DegP PDZ2up	cgatccatgggacagaatcaggttgattc	<i>NcoI</i>
DegPPDZ1low	aataaaagcttctggctgctctgctgcagttcc	<i>HindIII</i>
DegPS210A NgoMIV	caaccgtggtaacgccggcggtgcgctggttaac	<i>NgoMIV</i>
DegPS210A NgoMIVrev	gttaaccagcgcaccgccggcggtaccacgggtg	<i>NgoMIV</i>
DegS PDZlow	ggcgaagcttattggtgcccgcgattcctg	<i>HindIII</i>
DegS PDZup	tgaattttccatgggtcgcgtgatccgcggct	<i>NcoI</i>
E193A for	gggcgtagcggcctgaatgcggccaaactacgaaaac	<i>EaeI</i>
E193A rev	gttttcgtagtggccgattcaggccgctacgccc	<i>EaeI</i>
E196Afor	gaatgccgaaaactacgcaaacttcacagacc	-
E196Arev	Ggtctggatgaagtttgcgtagtttcggcattc	-
F198A for	gccgaaaactacgaaaacgcgattcagaccgatgcagcgatcaac c	<i>HinfI</i>
F198A rev	ggttgatcgctgcacggctctgaatcgcttttcgtagttttcggc	<i>HinfI</i>
G189A for new	gcgctggggcgtagcgcgctgaatgccgaaaac	<i>AfeI</i>
G189A rev new	gttttcggcattcagcgcgctacgccccagcgc	<i>AfeI</i>
L190A for	ctggggcgtagcggcgccaatgccgaaaactac	<i>NarI</i>
L190A rev	gtagttttcggcattggcgccgctacgccccag	<i>NarI</i>
L265NKpnI	ccaggtgaaacgcggtgagaatggtattatgggtaccgagctgaactccgaactgg	<i>KpnI</i>
L265NkpnIrc	ccagttcggagttcagctcgggtaccataataaccattctaccgcgtttcacctgg	<i>KpnI</i>
M268QStyI	gtgaaacgcggtgagctgggtatccaagggactgagctgaactccgaac	<i>StyI</i>
M268QStyIrc	gttcggagttcagctcagtccttggtaccagctcaccgcgtttcac	<i>StyI</i>
N191A for new	gggcgtagcggcctggctgcagaaaactacgaaaacttc	<i>PstI</i>
N191A rev new	gaagttttcgtagttttctgcagccaggccgctacgccc	<i>PstI</i>

Bezeichnung	Nucleotidsequenz (5' → 3')	Schnittstelle
N197A for	cctgaatgccgaaaactacgaagctttcatccagaccgatgc	<i>HindIII</i>
N197A rev	gcatcggtctggatgaaagcttcgtagttttcggcattcagg	<i>HindIII</i>
noncsDPDZ2BgII	tccagatctctgattctggctgctctgctgc	<i>BglII</i>
R187A rev	cggcattcaggccgctagcccctagggcagagacaatcc	<i>StyI</i>
R187Afor	ggattgtctctgccctaggggctagcggcctgaatgccg	<i>StyI</i>
S188A for	ggattgtctctgccctagggcgtgccggcctgaatgcc	<i>StyI</i>
S188A rev	ggcattcaggccggcagccctagggcagagacaatcc	<i>StyI</i>
T7promoter primer	taatacgactcactataggg	-
T7termprimer	gctagtattgctcagcgg	-

3.5 Antiseren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antiseren sind in Tab. 3-4 aufgeführt.

Tab. 3-4: Verwendete Antiseren

Antikörper/Antiserum	Herkunft
Anti-Mouse-IgG-AP	Sigma-Aldrich, München
Anti-Rabbit IgG-HRP	Sigma-Aldrich, München
Mouse-anti-OmpC	Laborsammlung
Penta His Antibody	Qiagen, Crawley, West Sussex, UK
Polyclonal Goat-Anti Rabbit Immunoglobulins/AP	Dako Cyomation, Glostrup, Dänemark
Rabbit-anti-DegP-MBP	Laborsammlung

3.6 Proteine und Enzyme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Proteine und Enzyme sind in den Tab. 3-5 und Tab. 3-6 aufgeführt.

Tab. 3-5: Verwendete Enzyme

Enzym	Herkunft
DNA Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, New England Biolabs, Beverly, MA, USA
T4 DNA Ligase	Promega, Madison, WI, USA
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, Beverly, USA

Tab. 3-6: Verwendete Proteine

Protein	Herkunft
β -Casein	Sigma-Aldrich, München
BSA (Rinderserumalbumin)	New England Biolabs, Beverly, USA
Casein, Resorufin markiert	Roche, Lewes, East Sussex, UK
Casein-Hydrolysat	Sigma-Aldrich, München
DegP	Diese Arbeit
DegP _{Δ189-195}	Diese Arbeit
DegP _{ΔPDZ1+2}	Diese Arbeit
DegP _{ΔPDZ2}	Diese Arbeit
DegP _{ΔPDZ2, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{E193A}	Diese Arbeit
DegP _{E193A, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{E196A}	Diese Arbeit
DegP _{E196A, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{F198A}	Diese Arbeit
DegP _{F198A, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{F240A}	Diese Arbeit
DegP _{F321N}	Diese Arbeit
DegP _{F321N, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{G189A}	Diese Arbeit
DegP _{G189A, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{I228A}	Diese Arbeit
DegP _{I229A}	Diese Arbeit
DegP _{I229A, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{I236A}	Diese Arbeit
DegP _{I238A}	Diese Arbeit
DegP _{I267N}	Diese Arbeit
DegP _{I267N, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{L190A}	Diese Arbeit
DegP _{L190A, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{L265N}	Diese Arbeit
DegP _{L265N}	Diese Arbeit
DegP _{L265N, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{L324N}	Diese Arbeit
DegP _{L324N, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{M268Q}	Diese Arbeit
DegP _{M268Q, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{N191A}	Diese Arbeit
DegP _{N191A, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{N197A}	Diese Arbeit
DegP _{N197A, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{R187A}	Diese Arbeit
DegP _{R187A, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{R262A}	Diese Arbeit
DegP _{R262A, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{R262A, V328S}	Diese Arbeit

Protein	Herkunft
DegP _{R262A, V328S, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{S188A}	Diese Arbeit
DegP _{S188A, S210A}	Diese Arbeit
DegP _{S210A}	Diese Arbeit
DegP _{V328S}	Diese Arbeit
DegP _{V328S, S210A}	Diese Arbeit
DegS	Hasenbein
MalS	Merdanovic
PDZ aus DegS	Diese Arbeit
PDZ1 aus DegP	Diese Arbeit
PDZ1+2 aus DegP	Diese Arbeit
PDZ2 aus DegP	Diese Arbeit

3.7 Peptide

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Peptide sind in Tab. 3-7 aufgeführt.

Tab. 3-7: Verwendete Peptide

Peptid	Herkunft
DNRDGNVYFF	Kaiser, CGC Dortmund
DNRDGNVYLF	Kaiser, CGC Dortmund
DNRDGNVYQF	Clausen, IMP Wien
DNRDGNVYSF	Kaiser, CGC Dortmund
DNRDGNVYWF	Kaiser, CGC Dortmund
DNRDGNVYYF	Kaiser, CGC Dortmund
DPMFKLV	Kaiser, CGC Dortmund
DPMFKLV-pNA	Kaiser, CGC Dortmund
SPMFKGV-pNA	Clausen, IMP Wien
SPMFKGV	Kaiser, CGC Dortmund

3.8 DNA- und Proteinstandards

FPLC Gelfiltrations MW Standard	BioRad, München
NuPAGE Novex Proteinmarker	Invitrogen, Karlsruhe
Preciosion Plus Protein Standards	BioRad, München
Quick-Load 2-Log DNA Ladder	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range	BioRad, München

3.9 Reaktions- und Nachweis-Kits

Nucleobond PC 100	Macherey & Nagel, Düren
Protino Ni-TED 2000	Macherey-Nagel, Düren
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Super Signal West Pico Chemi-luminescence Substrate-Kit	Pierce Biotechnology, IL, USA

3.10 Chemikalien

Die für die Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

3.11 Geräte

Autoklav	BeliMed, Mühldorf am Inn
Elektrophoreseapparaturen	BioRad, München
Elektroporation Micropulser	BioRad, München
FPLC-Äkta	GE Healthcare, München
French Press	Thermo, Schwerte
Geldokumentation	Intas, Göttingen
Horizontalschüttler	Grant Böckler, Cambridge, UK
Inkubationsschüttler Innova 44	New Brunswick, New Jersey, USA
ITC VP-ITC Calorimeter	Microcal, Wolverton Mill, UK
Magnetrührer RH basic 2	IKA, Staufen
Mini Trans-Blot Cell	BioRad, München
PCR Tpersonal Cyclor	Biometra, Göttingen
pH-Meter	Schott, Mainz
Qstar Elite Massenspektrometer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Scanner	UMAX, Astra 4000U, Willich
Spannungsgerät Power Pac 200	BioRad, München
Speed-Vac Concentrator 5301-R	Eppendorf, Hamburg
Spektrometer Genios Pro	Tecan, Crailsheim
Spektrometer Smart Spec Plus	BioRad, München

Standzentrifuge Avanti J-E	Beckman Coulter, Krefeld
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Ultimate™ Nano-HPLC-System	Dionex/LC Packings, Amsterdam, NL
Waagen	Kern, Balingen-Frommern

Alle hier nicht aufgeführten Geräte entsprechen den üblichen Laborstandards.

3.12 Diverses

Deoxynucleotide Solution Mix	New England Biolabs, Beverly, USA
Dialysemembranen Zellu TransT1	Roth, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten, 2mm	PeqLab, Erlangen
Gelfiltrationskalibrierungskit LMW & HMW	GE Healthcare, München
HPLC-Säule Synergi HydroRP	Phenomenex, Aschaffenburg
NuPAGE Novex Midi 3-8% Tris Acetate gradient Gele	Invitrogen, Karlsruhe
PD10 Columns	GE Healthcare, München
PVDF Membran Amersham Hybond P	GE Healthcare, München
SFCA bottle top filters 500 ml, 0,2 µm	Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, NY, USA
Sterilfilter 0,45 µm Supor Membrane	PALL, East Hills, NY, USA
Vivaspin 15R, 5 kDa-100 kDa	Vivascience, Stonehouse, UK
Zellulosemembran, Whatman, 19x 29 cm	GE Healthcare, München

3.13 Mikrobiologische Methoden

3.13.1 Sterilisation

Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden zur Sterilisation für 20 min bei einem Druck von 2 bar und einer Temperatur von 120°C autoklaviert. Die Sterilisation von hitzelabilen Lösungen erfolgte durch Filtration (0,2 µm Membran). Glasgeräte wurden für 4 h hitzesterilisiert.

3.13.2 Bakterienanzucht

3.13.2.1 Herstellung von Nährmedien

Für die Herstellung von Flüssigmedien und Nährböden wurden die entsprechenden Substanzen eingewogen, mit A. dest. aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Bei Bedarf wurden die Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen mit Zusätzen versetzt.

NZA-Medium

Hefeextrakt	5 g
NZ-amin A	10 g
NaCl	5 g
A. dest.	ad 1000 ml

NZA-Agar

Agar	15 g
NZA-Medium	ad 1000 ml

3.13.2.2 Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika wurden in A.dest. gelöst und steril filitriert. Es wurden konzentrierte Stammlösungen angesetzt und den Medien die entsprechende Menge nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf mindestens 50°C zugefügt.

Antibiotikum	Endkonzentration	Stammlösung
Ampicillin	200 µg/ml	200 mg/ml
Kanamycin	100 µg/ml	100 mg/ml

3.13.2.3 Andere Medienzusätze

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) wurde als 1 M Stammlösung in A. dest. gelöst und steril filtriert. Je nach Versuchsbedingung wurden induzierbare Stämme mit einer Endkonzentration von 10 μ M bis 1 mM IPTG induziert.

3.13.2.4 Anzucht von *E. coli*

E. coli wurde auf Festmedium (NZA-Agarplatten) oder in Flüssigkultur kultiviert. Je nach Versuchsbedingungen betrug die Temperatur zur Anzucht 20 bis 43°C. Flüssigkulturen wurden von Stammpplatten mit Einzelkolonien beimpft. Kulturvolumina bis 5 ml wurden auf einem Brutroller, größere Volumina auf einem Rundschüttler bei 180 rpm inkubiert. Nach einer Anzucht von mindestens 12 h wurden die Kulturen als Übernachtskultur (ÜN-Kultur) bezeichnet.

3.13.2.5 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Zellzahl in *E. coli*-Flüssigkulturen wurde durch das Messen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Bio-Rad-Photometer bestimmt. Nach Miller entspricht eine OD₆₀₀ von 1 etwa 10⁷ μ g/ml Protein und einer Zellzahl von ca. 10⁹ Zellen pro ml (Miller, 1972).

3.14 Molekularbiologische Methoden

3.14.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen. Für Klonierungen wurde die DNA über das Midi-Kit Nucleo Bond PC 100 der Firma Macherey-Nagel isoliert.

3.14.2 Methoden zur Charakterisierung von DNA

3.14.2.1 Restriktionshydrolysen von Plasmid-DNA

Restriktionshydrolysen wurden zur Überprüfung der genotypischen Korrektheit von Plasmiden und zur DNA-Klonierung durchgeführt. Es wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II (Zabeau und Roberts, 1979) der Firma New England Biolabs verwendet.

Die Wahl des Restriktionspuffers, der Inkubationstemperatur sowie der Inkubationsdauer richtete sich nach den Herstellerangaben.

3.14.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von doppelsträngiger DNA erfolgte je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente in 0,8–3%igen horizontalen Agarosegelen in 1 x TAE-Puffer (Maniatis *et al.*, 1982). Die angelegte Spannung bzw. Stromstärke und die Laufzeit waren von den gewünschten Trenneffekten abhängig. Vor dem Auftragen der DNA-Proben wurde diese mit DNA-Probenpuffer versetzt. Das Anfärben der DNA erfolgte in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml in TAE-Puffer). Die DNA wurde mittels Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (302 nm) auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Videodokumentationssystems.

6 x DNA-Probenpuffer

Glycerol	30 ml
0,5 M EDTA; pH 8,0	30 ml
Bromphenolblau	30 mg
A. dest.	ad 100 ml

50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)

Tris-Base	242 g
Acetat	57,1 ml
0,5 M EDTA; pH 8,0	100 ml
A. dest.	ad 1000 ml

3.14.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie durchgeführt. Dazu wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Smart Spec Plus Photometer, Bio-Rad). Zur Berechnung der Konzentration wurden folgende Beziehungen verwendet:

$A_{260}=1,0$ entsprechen 37 µg einzelsträngiger Nucleinsäure/ml

$A_{260}=1,0$ entsprechen 50 µg doppelsträngiger Nucleinsäure/ml.

3.14.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung von rekombinanten Plasmiden wurde als Auftragsarbeit von der Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt.

3.14.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Klonierung wurden DNA-Fragmente nach der elektrophoretischen Auftrennung (siehe 3.14.2.2) aus dem Agarosegel eluiert.

Dazu wurde das gewünschte Fragment mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend die DNA mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen eluiert.

3.14.4 Ligierung von DNA-Fragmenten

Für die Ligierung von DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA Ligase der Firma Promega verwendet. Nachdem Vektor und Insert aus einem Agarosegel eluiert wurden (siehe 3.14.3), wurden diese im Verhältnis 1:3 und 1:1 in einem Reaktionsansatz mit einer Weiss Unit der T4 DNA Ligase und 1 µl des 10-fach konzentrierten Ligationspuffers vermischt. Der Ansatz wurde mit A. dest. Wasser auf 10 µl eingestellt und es folgte eine Inkubation im Wasserbad bei 4°C über Nacht. Nach der Hitzeinaktivierung für 20 min bei 70°C wurden 1 bis 4 µl des Reaktionsansatzes in der Elektrotransformation kompetenter Zellen eingesetzt. Zur Kontrolle wurde ein Ligationsansatz ohne Insert durchgeführt und dieser ebenfalls zur Transformation eingesetzt.

3.14.5 Transformation

3.14.5.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Um eine hohe Transformationseffizienz zu erreichen, wurde die Methode der Elektrotransformation nach Sambrook *et al.* gewählt (Sambrook *et al.*, 1989). Für die Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden dazu 500 ml NZA-Medium mit 5 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 kultiviert. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis wurden die Zellen für 15 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 ml kaltem A. dest. resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 250 ml kaltem A. dest. aufgenommen und wiederholt zentrifugiert. Das Sediment wurde daraufhin in 20 ml 10% Glycerol resuspendiert, zentrifugiert und schließlich in 0,5 ml 10% Glycerol aufgenommen. Die Zellen wurden aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.14.5.2 Elektrotransformation

Die Elektrotransformation erfolgte nach Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden 40 µl kompetente *E.coli*-Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 4 µl (oder ca. 5-7 ng) Plasmid-DNA vermischt. Die Zellen wurden in eine kalte Elektroporationsküvette überführt und die Transformation durch Elektroschock im Micro Pulser (Bio Rad) (25 mF; 2,5 kV; 200 Ω) induziert. Anschließend wurde der Ansatz mit 900 µl NZA-Medium (siehe 3.13.2) vermischt und zur phänotypischen Expression 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

3.14.5.3 Herstellung transformationskompetenter Zellen für die Transformation durch Hitzeschock

Für Transformationen, die eine weniger hohe Effizienz erforderten, wurde die Transformation durch Hitzeschock nach Sambrook und Russell durchgeführt (Sambrook und Russell, 2001). Der zu transformierende *E. coli*-Stamm wurde über Nacht bis zu einer stationären Wachstumsphase angezogen. Es wurden 250 ml NZA-Medium (siehe 3.13.2) mit 2,5 ml der ÜN-Kultur beimpft und die Kultur bei 37°C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5 - 0,7$) inkubiert. Im Anschluss wurde die Ausgangskultur 10 min auf Eis gelagert und anschließend 10 min bei 4.000 rpm in einer Kühlzentrifuge (4°C) sedimentiert. Das Sediment wurde in 80 ml kaltem Transformationspuffer resuspendiert und 10 min auf Eis gelagert. Nach einer weiteren Zentrifugation von 10 min bei 4.000 rpm bei 4°C wurden die *E. coli*-Zellen in 20 ml Transformationspuffer aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden nach Zugabe von DMSO (Endkonzentration 7 %) 10 min auf Eis gestellt, anschließend schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Transformationspuffer

CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
PIPES	10 mM
MnCl ₂	55 mM
pH 6,7	

3.14.5.4 Transformation der kompetenten Bakterienzellen mit Plasmid-DNA mittels Hitzeschock

Jeweils 200 µl kompetente Zellen wurden mit DNA-Lösung (Ligationsansätze oder isolierte Plasmid-DNA, 1-10 µl) vermischt und 20 min auf Eis gelagert. Nach einem 1-minütigen Hitzeschock bei 42°C wurden 800 µl NZA-Medium (siehe 3.13.2) zu den Zellen gegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 50 und 100 µl des Transformationsansatzes auf dem entsprechenden Selektivmedium ausplattiert. Der restliche Ansatz wurde zentrifugiert (1 min, 14.000 rpm, RT), die Zellen im Rücklauf resuspendiert und anschließend ebenfalls auf der entsprechenden Selektivagarplatte ausplattiert.

3.14.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen sowie für die genotypische Überprüfung von DNA-Konstrukten (Mullis und Faloona, 1987). Dabei wird eine spezifische DNA-Sequenz durch wiederholte Syntheszyklen mit spezifischen Startermolekülen (Oligonukleotiden) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase *in vitro* vervielfältigt. In dieser Arbeit wurden als Polymerasen die Taq-, die Phusion- sowie die PfuUltra-Polymerase (siehe 3.6) eingesetzt. Die Auswahl der Sequenz der bei der PCR verwendeten Oligonukleotide sowie die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „Amplify v 3.0.1“. Für Klonierungen wurden ausschließlich Oligonukleotide verwendet, die nach der Synthese über die HPLC gereinigt wurden (siehe 3.4). Als Anlagerungstemperatur wurden von der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Oligonukleotide fünf Grad Celsius abgezogen. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem Biometra T Personal Cycler durchgeführt. Das Protokoll wurde je nach verwendeten Oligomeren, DNA-Polymerase und Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepasst.

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten für die anschließende Klonierung wurde die Phusion High Fidelity Polymerase eingesetzt. Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Matrizen-DNA	2,5 µg Plasmid-DNA
10 µM Oligonukleotid 1	1,25 µl
10 µM Oligonukleotid 2	1,25 µl
dNTPs (10 mM stock)	0,5 µl
5 x Reaktionspuffer	5 µl
DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,25 µl
DMSO (optional)	0,75 µl
A. dest.	ad 25 µl

Folgendes Protokoll wurde angewendet:

1 x	30 sec	98°C
30x	10 sec	98°C
	20 sec	5°C unter Schmelztemperatur
	15 sec/kb	72°C
1 x	5 min	72°C

Anschließend wurden die Anätze für die weiteren Schritte der Klonierung aufgereinigt (siehe 3.14.7).

3.14.6.1 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung von Bakterien-Kolonien auf eine korrekte Plasmid-Insertion wurde die PCR direkt von den Bakterien-Kolonien mit Plasmid- bzw. Insertspezifischen Primern durchgeführt werden (Dallas-Yang *et al.*, 1998). Hierzu wurde eine Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher in 10 µl H₂O überführt, 5 min bei 99°C inkubiert und 10 min zentrifugiert (Tischzentrifuge, 13000 rpm, RT).

Anschließend wurden 2 µl des Überstandes mit folgenden Komponenten vermischt und ein PCR-Standardprogramm durchgeführt:

10 µM Oligonukleotid 1	1,25 µl
10 µM Oligonukleotid 2	1,25 µl
dNTPs (10 mM stock)	0,5 µl
10 x Reaktionspuffer	2,5 µl
Taq DNA-Polymerase	0,1 µl
DMSO (optional)	0,75 µl
A. dest.	ad 25 µl

Es wurde folgendes Protokoll angewendet:

1 x	2 min	94°C
25x	15 sec	94°C
	15 sec	5°C unter Schmelztemperatur
	1 min/kb	72°C
1 x	5 min	72°C

Anschließend wurden die Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.14.2.2).

3.14.6.2 Oligomutagenese

Um einzelne Aminosäuren an einer bestimmten Position in einem Protein auszutauschen, wurden vorerst zwei komplementäre Oligonukleotide generiert, die für die gewünschte Aminosäuresequenz kodieren. Wenn möglich wurde ebenfalls eine Restriktionsschnittstelle eingefügt, so dass nach der Oligomutagenese eine Selektion durch Restriktion möglich war. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 3-3 dargestellt. Anschließend wurde eine PCR mit der Pfu Ultra Polymerase, den generierten Oligonukleotiden und entsprechenden Ausgangsplasmiden durchgeführt.

PCR-Ansatz:

Plasmid	5 ng
10 µM Oligonukleotid 1	1 µl
10 µM Oligonukleotid 2	1 µl
dNTPs (10 mM stock)	0,625 µl
10 x Reaktionspuffer	2,5 µl
Pfu Ultra Polymerase	0,5 µl
DMSO (optional)	0,75 µl
A. dest.	ad 25 µl

Es wurde folgendes Protokoll angewendet:

1 x	2 min	95°C
25x	30 sec	95°C
	30 sec	5°C unter Schmelztemperatur
	1 min/kb	72°C
1 x	10 min	72°C

Nach der PCR-Reaktion wurden dem Ansatz 2 µl des Restriktionsenzym *DpnI* zugeführt um die methylierte Plasmid-DNA zu verdauen. Es folgte ein Inkubationsschritt für 2 h bei 37°C. Anschließend folgte eine Transformation kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock (siehe 3.14.5.4).

3.14.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Dienten die in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente einer Klonierung, so wurde der Reaktionspuffer über das Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) entfernt und die DNA umgepuffert. Nach der Restriktionshydrolyse (siehe 3.14.2.1) wurde das gewünschte DNA-Fragment über Agarosegelelektrophorese (siehe 3.14.2.2) aufgetrennt und isoliert.

3.14.8 Plasmidkonstruktionen

Die Tab. 3-2 zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide.

3.14.8.1 Konstruktion der Plasmide pNK11, pNK12, pNK13 und pNK14

Die Plasmide pNK11, pNK12, pNK13 und pNK14 wurden zur Reinigung der einzelnen PDZ-Domänen von DegP und DegS verwendet. Dabei sollten die Domänen über einem C-terminalen His-Tag gereinigt werden. Im ersten Schritt wurden dazu Oligonukleotide generiert, die als Startermoleküle für jeweils eine PCR dienten. In diese Oligonukleotide wurden Schnittstellen (*NcoI* und *HindIII*) für die anschließende Klonierung eingefügt (siehe Tab. 3-3). Anschließend wurde eine PCR mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase und dem Ausgangsplasmid pCS20 (für die PDZ-Domänen aus DegP) bzw. pDegS (für die PDZ-Domäne aus DegS) durchgeführt (siehe 3.14.6). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *HindIII* hydrolysiert.

Als Zielvektor wurde der Expressionsvektor pET21d ausgewählt und auch dieser mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *HindIII* geschnitten. Es folgte eine Agarosegelelektrophorese (siehe 3.14.2.2) mit anschließender Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel (siehe 3.14.3). Der geöffnete Vektor wurde mit dem PCR-Produkt ligiert und der Ligationsansatz anschließend in den Stamm DH5α transformiert.

Tab. 3-8 zeigt zusammenfassend die Charakteristika der konstruierten Plasmide bzw. der PDZ-Domänen.

Tab. 3-8: Konstruktion der Plasmide pNK11, pNK12, pNK13 und pNK14

Plasmid	Oligonukleotide zum Hersellen des Plasmids	Domäne	Länge des Gens [bp]	Molekulargewicht der PDZ-Domäne [kDa]
pNK11	DegP PDZ1up DegP PDZ1low	PDZ1 aus DegP	325	10,49
pNK12	DegP PDZ2up DegP PDZ2low	PDZ2 aus DegP	292	9,54
pNK13	DegP PDZ1up DegP PDZ2low	PDZ1+2 aus DegP	590	19,88
pNK14	DegS PDZup DegS PDZlow	PDZ aus DegS	335	10,87

3.14.8.2 Konstruktion der Plasmide zur Expression der DegP-Punktmutanten

Zur Konstruktion der für die Expression der DegP-Punktmutanten verwendeten Plasmide wurden gezielt Oligomutagenesen mittels PCR durchgeführt (siehe 3.14.6.2). Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 3-3 dargestellt.

3.15 Biochemische Methoden

3.15.1 Gesamtproteinisolierung aus *E. coli*

Die *E. coli*-Testkultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und 1 ml der Kultur entnommen. Nach einer 3 minütigen Zentrifugation (13000 rpm, RT) wurde das Zellsediment in 80 µl SDS Probenpuffer und 30 mM DTT aufgenommen und die Probe 5 min bei 95°C erhitzt. Im Anschluß konnte die gelelektrophoretische Auftrennung folgen (siehe 3.15.5).

3.15.2 Acetonfällung von Proteinen

Die Fällung von Proteinen erfolgte durch Zugabe von 4 Volumenanteilen Aceton zu den entsprechenden Proben. Nach einer Inkubation über Nacht bei -20°C wurde der Ansatz 20 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (13000 rpm, 4°C) und der Überstand abgenommen. Das Sediment wurde 5 min in dem Speed-Vac Konzentrator getrocknet. Die Proteine wurden in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 15 µl des Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.15.5).

3.15.3 Proteinreinigung

Die Proteinreinigungen wurden mit Hilfe des Kits Protino Ni-TED 2000 der Firma Macherey-Nagel durchgeführt.

Die in der Tab. 3-6 aufgeführten PDZ-Domänen wurden aus dem Stamm BL21 (DE3) gereinigt. Alle anderen in dieser Arbeit gereinigten DegP-Derivate wurden aus dem Stamm MA001 gereinigt, der jeweils das entsprechende Plasmid enthielt. Der Stamm MA001 enthält kein funktionelles chromosomales *degP*, so dass ausgeschlossen werden kann, dass sich Oligomere aus chromosomalen und plasmidkodierten DegP Monomeren bilden.

Die Anzuchtbedingungen des jeweiligen Stammes und die Reinigungsschritte waren für alle Proteine identisch. Zur Anzucht wurde NZA-Medium (200 µg/ml Ampicillin) mit einer Einzelkultur beimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Rundschüttler bebrütet. Anschließend wurde eine Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,05 beimpft und die Zellen bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 geschüttelt. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 100 µM induziert und erfolgte über Nacht bei 20°C. Durch eine Zentrifugation (20 min, 5000 rpm, 4°C) wurden die Zellen sedimentiert und in Lysepuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte im Microfluidizer (M-110L Microfluidizer Processor, Microfluidics) bei einem Druck von 12 bar. Nach der Sedimentation der Zelltrümmer (30 min, 20000 rpm, 4°C) wurde der Überstand auf eine zuvor mit Lysepuffer äquilibrierte Säule geladen. Nicht bindende Proteine wurden mit Lysepuffer (2 x 4 ml) und Lysepuffer+1 M NaCl (2 x 4 ml) eliminiert. Im Anschluss wurde das gebundene Protein mit Elutionspuffer (3 x 3 ml) abgelöst und aufgefangen. Bei Bedarf wurden die Proben über Vivaspin-Röhrchen (Vivaspin 15R, 5-100 kDa, Vivascience, Stonehouse, UK) aufkonzentriert und anschließend über PD10 Säulen (GE-Healthcare) in den gewünschten Reaktionspuffer umgepuffert. Je nach Protein und dessen Verwendung erfolgte zusätzlich eine Dialyse (3 x 30 min) in Dialyseschläuchen Zellu Trans der Firma Roth.

Zur Aufbewahrung wurden die Proteine aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Während die Reinheit der eluierten Proteine über eine Coomassie-Färbung eines Acrylamidgels (siehe 3.15.7) ermittelt wurde, gab eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 3.15.4) Aufschluss über die Konzentration des Proteins.

Lysepuffer

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
pH 8,0	

Lysepuffer+1 M NaCl

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	1 M
pH 8,0	

Elutionspuffer

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
pH 8,0	

3.15.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Proteinproben wurde mit Hilfe des Reagenz Roti-Nanoquant (Roth) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurden 50 µl einer verdünnten Proteinprobe mit 200 µl des Reagenz vermischt und der Quotient aus der OD₅₉₀ und der OD₄₅₀ bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch den Vergleich mit einer vorher angefertigten BSA-Eichgerade (0,1 bis 1,6 mg/ml).

3.15.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) in einer Mini-Protean II Apparatur (BioRad, München) durchgeführt. Im 2,5%igen Sammelgel wurden die Proteine auf eine gemeinsame Laufhöhe gebracht und anschließend im Trenngel nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Dazu wurden die entsprechenden Proben zunächst in Probenpuffer mit 30 mM DTT aufgenommen. Die Proben wurden für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend 10 bis 15 µl auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurden 10 bis 15%ige Gele verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in SDS-Laufpuffer für etwa 1 h bei einer konstanten Spannung von 150 V durchgeführt.

Komponente	Trenngel			Sammel-gel
	10%	12%	15%	
Puffer A	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
Puffer B	-	-	-	2,5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglsg Rotiphorese Gel 30	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml	1,1 ml
A. dest.	4,2 ml	3,5 ml	2,5 ml	6,5 ml
TEMED	10 µl	10 µl	25 µl	20 µl
10 % APS	25 µl	25 µl	10 µl	40 µl

Puffer A

Tris-HCl	1,5 M, pH 8,8
SDS	0,4% (w/v)

Puffer B

Tris-HCl	0,5 M, pH 6,8
SDS	0,4% (w/v)

SDS-Probenpuffer 4 x

Tris-HCl; pH 6,8	0,2 M
SDS	8% (w/v)
Glycerol	40% (v/v)
Bromphenolblau	0,004% (w/v)

10 x SDS-Laufpuffer

Glycine	1,92 M
Tris-HCl; pH 8,3	333 mM
SDS	1% (w/v)

3.15.6 Tris-Tricin Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 1-100 kDa unter denaturierenden Bedingungen wurde die Tris-Tricin Gelelektrophorese nach Schägger und Jagow durchgeführt (Schägger und Jagow, 1987). Dafür wurden die zu untersuchenden Proteinproben in Probenpuffer mit 50 mM DTT aufgenommen und für 5 min bei 95°C erhitzt. Das Gel bestand aus den drei Bereichen Trenn-, Spacer- und Sammelgel, die in einem Verhältnis 2:1:1 angefertigt wurden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 1 h bei 30 V, für eine weitere Stunde bei 70 V und abschließend bei 150 V und 4°C.

Komponente	12,5% Trenngel	10% Spacergel	6% Sammelgel
37,5% Acrylamid/ 1% Bisacrylamid	3,3 ml	1,33 ml	0,8 ml
Gelpuffer	3,5 ml	1,75 ml	1,25 ml
Glycerol (14%)	1,44 ml	-	-
A. dest.	1,7 ml	1,89 ml	2,92 ml
10% APS	50 µl	25 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Gelpuffer

Tris-HCl; pH 8,45	4 M
SDS	0,3%

Kathodenpuffer

Tris Base	0,1 M
Tricin	0,1 M
SDS	0,1%

Anodenpuffer

Tris-HCl; pH 8,9	0,2 M
------------------	-------

4x Probenpuffer

0,5 M Tris-HCl; pH 6,8	4 ml
Glycerol	4,8 ml
SDS	1,6 g
Coomassie Brilliant Blau	4 mg
G250	
A. dest.	ad 10 ml

3.15.7 Coomassie-Färbung

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden Proteine mit Coomassie-Blau gefärbt. Dazu wurde die Färbemethode nach Fairbanks *et al.* leicht modifiziert durchgeführt (Fairbanks *et al.*, 1971). Das Gel wurde dazu für 1 min in der Lösung A in der Mikrowelle aufgekocht, 5 min leicht geschüttelt und schließlich jeweils in der Lösung B und Lösung C kurz aufgekocht. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte durch Schütteln in Lösung D bei Raumtemperatur für mindestens 1 h.

Lösung A

Isopropanol	25% (v/v)
Acetat	10% (v/v)
Coomassie R250	0,05% (w/v)

Lösung B

Isopropanol	10% (v/v)
Acetat	10% (v/v)
Coomassie R250	0,005% (w/v)

Lösung C

Acetat	10% (v/v)
Coomassie R250	0,002% (w/v)

Lösung D

Acetat	10% (v/v)
--------	-----------

3.15.8 Silberfärbung

Zum sensitiven Nachweis von Proteinen nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die Methode der Silberfärbung nach Beidler *et al.* durchgeführt (Beidler *et al.*, 1982). Auf diese Weise konnten Proteine in ng-Mengen nachgewiesen werden. Dazu wurden die Gele vorerst in Fixierer I unter leichtem Schütteln für 10 min fixiert und anschließend in der Silbernitratlösung 20 min gefärbt. Es folgten drei Waschschrte (je 60 sec) in A. dest. und eine anschließende Inkubation in Entwicklerlösung, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Abschließend fand eine 10 minütige Fixierung in Fixierer II statt.

Fixierer I

Ethanol	10% (v/v)
Essigsäure	0,5% (v/v)

Silbernitratlösung

Silbernitrat	0,19% (v/v)
--------------	-------------

Entwickler

NaOH	15 g/l
Natriumborhydrid	0,08 g/l
Formaldehyd	0,148% (v/v)

Fixierer II

Natriumcarbonat	0,75% (w/v)
-----------------	-------------

3.15.9 Western Immunoblotanalyse

Für einen spezifischen immunologischen Nachweis wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit einer Mini Trans-Blot Transfer Zelle (BioRad) auf eine PVDF- (Polyvinylidendifluorid) Membran (Hybond-P Membran 0,45 µm, Amersham Biosciences) übertragen. Der Transfer in Transferpuffer erfolgte für 1 h bei einer Spannung von 100 V.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran für 1 h bei RT auf dem Horizontalschüttler in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der PVDF-Membran mit dem primären Antikörper. Durch dreimaliges Waschen (je 5 min) der Membran in TBST wurde der ungebundene Antikörper von der Membran entfernt. Der Nachweis erfolgte anschließend über eine Inkubation (30 min) mit einem AP-gekoppelten sekundären Antikörper. Nach zwei weiteren Waschschritten (je 5 min in TBST) folgte die Detektion. Dazu wurde die Membran für 5 min in AP-Puffer äquilibriert und anschließend in einer Färbelösung entwickelt. Die verwendeten Antikörper sowie die genauen Bedingungen für die jeweiligen Western Immunoblotanalysen sind in der Tab. 3-9 aufgeführt.

Tab. 3-9: Verwendete Antikörper und Versuchsbedingungen

Primärer Antikörper	Konzentration/ Bedingung	Blockierungslösung	Sekundärer Antikörper
Anti-DegP	1:20.000 in TBST+2% (w/v) BSA 1h, RT	TBST + 2% (w/v) BSA, 1h, RT	Anti-rabbit AP 1:20.000 in TBST + 2% (w/v) Milch, 30 min, RT
Anti- OmpC	1:20.000 in TBST+2% (w/v) BSA, 1h, RT	TBST + 2% (w/v) BSA, 1h, RT	Anti-rabbit AP 1:20.000 in TBST + 2% (w/v) Milch, 30 min, RT
Penta His Antibody	1: 2.500 in TBST + 2% (w/v) BSA, 1 h, RT	TBST + 2% (w/v) BSA, 1 h, RT	Anti-mouse IGG (Fc-Fragment) AP 1:20.000 in TBST + 2% (w/v) Milch, 1 h, RT

Transferpuffer

Tris-HCl; pH 8,3	15 mM
Glycin	120 mM
SDS	0,2% (w/v)
Methanol	20% (v/v)

TBST

Tris-HCl; pH 7,5	30 mM
NaCl	150 mM
Tween-20	0,05% (v/v)

AP-Puffer

Tris-HCl; pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

Färbelösung

AP-Puffer	10 ml
NBT	66 µl
(50 mg/ml in 70% DMF)	
BCIP	33 µl
(50 mg/ml in 70% DMF)	

3.15.10 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von DegP und DegP-Derivaten

3.15.10.1 Gelfiltration

Die multimere Organisation von DegP und DegP-Derivaten mit und ohne Aktivatoren kann durch die Gelfiltration bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde dafür je nach dem gewünschten Auftrennungsbereich eine Superdex200 10/300 GL (Auftrennung im Bereich 10-600 kD) oder eine Superdex75 10/300 GL (Auftrennung im Bereich 3-70 kD) der Firma GE Healthcare eingesetzt. Es wurde die automatisierte FPLC-Anlage Äkta von GE Healthcare verwendet. Die Säulen wurden vor der Gelfiltration mit Laufpuffer äquilibriert, wobei die Flussrate 0,5 ml/min betrug. Das Auftragsvolumen der Proben betrug 250 µl und es wurden

Proteinkonzentrationen zwischen 1 und 3 mg/ml eingesetzt. Die Eichung der Säulen erfolgte nach Anleitung des Gelfiltrationskalibrierungskits LMW & HMW von GE Healthcare.

Laufpuffer

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	150 mM
pH 8,0	

3.15.10.2 Cross-Link Methode

Für die Bestimmung der oligomeren Zustände von DegP und DegP-Derivaten mit und ohne Aktivator wurde die Methode des Cross-Links eingesetzt. Dabei wurden 2 µM des entsprechenden Proteins mit und ohne Aktivator im Reaktionspuffer für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe des Cross-Linkreagens Glutaraldehyd in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) erfolgte die Probenentnahme nach 2 min. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von Stopplösung unterbrochen und die Ansätze für 10 min in dieser inkubiert. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 40°C wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt (NuPAGE Novex Midi Gel, Invitrogen). Im Anschluss erfolgte eine Silberfärbung (siehe 3.15.8).

Reaktionspuffer

NaH ₂ PO ₄	62,5 mM
pH 8,0	

Stopplösung (10x)

Tris-HCl; pH 8,0	500 mM
------------------	--------

Elektrophoresepuffer

Tricin	89,5 g
Tris Base	60,6 g
SDS	10 g
A. dest.	ad 500 ml

3.15.11 Nano-HPLC mit MS-Kopplung (Nano-LC-MS/MS)

Bei der Nano-LC-MS/MS handelt es sich um eine Methode, bei der zwei verschiedene Techniken hintereinander geschaltet werden. Dabei wird eine Nano-HPLC (Nano-High Performance Liquid Chromatographie) mit einem Massenspektrometer (MS) gekoppelt. Die Methode ist gut geeignet zur Peptidsequenzierung nach einem Verdau von Proteinen. Durch die Nano-HPLC lässt sich die Nachweisempfindlichkeit gegenüber der konventionellen HPLC um ein Vielfaches steigern. Außerdem ermöglicht sie eine bessere Handhabung für die Kopplung an die MS, da das Splitten des Eluats überflüssig wird.

In dieser Arbeit wurden die Nano-LC-MS/MS-Analysen mit dem Qstar Elite Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems durchgeführt, das an ein UltimateTM Nano-HPLC-System (Dionex/LC Packings) gekoppelt war.

Die zu identifizierenden Peptide wurden zuerst auf einer Umkehrphase (Reversed Phase; RP)-Anreicherungssäule (Synergi HydroRP, 4 µm Partikelgröße, 80 Å Porengröße, Phenomenex) mit einem Innendurchmesser von 100 µm in 0,1% TFA vorkonzentriert. Anschließend wurden die Peptide auf einer RP-Säule (Synergi HydroRP, 2 µm Partikelgröße, 80 Å Porengröße, Phenomenex) mit einem Innendurchmesser von 75 µm getrennt. Dazu wurde eine 41 minütige binäre Gradienteneluierung (Lösungsmittel A: 0,1% FA, Lösungsmittel B: 0,1% FA, 84% Acetonitril) angewandt, wobei das Lösungsmittel B über 40 min von 5% bis 50% und über 1 min von 50% bis 95% eingesetzt wurde. Die Flussrate betrug 270 nl/min.

Anschließend wurden die Proben in einem Massenspektrometer (350-2000 m/z) vermessen und die drei stärksten Signale unterlagen der MS/MS, wobei der dynamische Ausschluss aktiviert wurde. Für die LTQ-XL Orbitrap-Messungen wurden die MS-Messungen im Orbitrap bei einer Auflösung von 60000 durchgeführt und die fünf stärksten Signale der MS/MS in Verbindung mit der Funktion des dynamischen Ausschlusses unterzogen.

Die Auswertung der Spektren erfolgte über das Program Mascot 2.2.2 (Peptidmasse und Fragmenttoleranz betrugen $\pm 0,2$ Da für Qstar Elite; MS-Toleranz betrug $+0,02$ Da und MS/MS-Toleranz $\pm 0,5$ Da für die LTQ-XL Orbitrap-Daten). Nur Peptide mit einem Score von über 35 wurden in die weitere Auswertung einbezogen.

3.15.12 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von DegP und DegP-Derivaten

3.15.12.1 Spaltung von pNA-Peptiden

Die proteolytische Aktivität von Proteasen kann durch Peptide, die eine C-terminal gekoppelte p-Nitroanilin-Gruppe (pNA) tragen, bestimmt werden. Wird eine solches Peptid zwischen der pNA-Gruppe und der damit verknüpften Aminosäure gespalten, so ist die Menge des freigesetzten p-Nitroanilin ein Maß für die Proteaseaktivität und kann photometrisch quantifiziert werden. Für die proteolytische Aktivität von DegP wurden die Peptide SPMFKGV-pNA sowie DPMFKLV-pNA in einer Endkonzentration von 0,5 mM eingesetzt und mit 1 µM bzw. 0,1 µM Protein vermischt. Je nach Versuchsanordnung wurden ebenfalls aktivierende oder inhibierende Substanzen dazu zugegeben und mit dem Protein vorinkubiert.

Der Ansatz wurde mit Reaktionspuffer auf 100 µl aufgefüllt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm kontinuierlich bei entsprechender Temperatur für 1 h gemessen. Die angegebenen spezifischen Aktivitäten beruhen auf jeweils mindestens dreimaligen Doppelbestimmungen und ergaben sich aus folgender Formel:

$$\text{Spezifische Aktivität [nmol x mg}^{-1} \text{ x min}^{-1}] = \frac{\Delta A_{405} \times V}{c \times \epsilon \times t}$$

ΔA_{405} : Absorptionsänderung bei $\lambda=405$ nm über den Messzeitraum

V: Endvolumen des Reaktionsansatzes [ml]

c: Proteinkonzentration [mg/ml]

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient des pNA [$8.800 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

t: Messzeit [min]

Reaktionspuffer

NaH₂PO₄ 50 mM

pH 8,0

3.15.12.2 Abbau von β -Casein

Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität von DegP und DegP-Derivaten wurde 1 μ M Protein mit 4 μ M β -Casein im Reaktionspuffer vermischt. Der Ansatz wurde für 24 min bei 37°C inkubiert, wobei in Abständen von 3 min Proben von 20 μ l entnommen wurden und mittels Acetonfällung gefällt wurden.

Anschließend wurden die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert (siehe 3.15.5).

3.15.12.3 Zymogramm

Um den Abbau von Casein durch DegP nachzuweisen, wurde eine weitere Methode angewendet, bei der das zu testende Protein auf ein nicht denaturierendes Zymogramm-Gel aufgetragen wurde, das Casein (0,1% w/v) enthielt. Der Abbau von Casein wurde anschließend durch eine Caseinanfärbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das zu testende Protein mit Z-Probenpuffer versetzt und auf das Zymogramm-Gel aufgetragen. Das Gel wurde im TG-Laufpuffer für 100 min einer Spannung von 100 V ausgesetzt und anschließend 30 min bei Raumtemperatur in Renaturierungs-Puffer inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation in Entwicklungspuffer über Nacht bei 37°C.

Nach der Entwicklung erfolgte die Färbung durch eine einstündige Inkubation in Färbelösung und durch eine abschließende Entfärbung für 30 bis 60 min in Entfärbelösung.

Z-Probenpuffer (1x)

Tris-HCl; pH 6,8	62,5 mM
SDS	4% (w/v)
Glycerin	25% (v/v)
Bromophenolblau	0,01% (w/v)

TG-Laufpuffer (1x)

Tris-Base; pH 8,3	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1% (w/v)
A. dest.	ad 500 ml

Renaturierungs-Puffer

Triton X-100	2,5% (v/v)
--------------	------------

Entwicklungspuffer

Tris-HCl; pH 7,5	50 mM
NaCl	200 mM
CaCl ₂	5 mM
Brij-35	0,02% (v/v)

Färbelösung

Methanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Coomassie-Blau R-250	0,5% (w/v)

Entfärbelösung

Methanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

3.15.13 Komplementation der Hitzesensitivität eines *degP*⁻-Stammes durch *DegP* und *DegP*-Derivate

degP⁻-Stämme sind hitzesensitiv und können bei Temperaturen über 42°C nicht mehr wachsen, da die Zellen lysieren. Um Hinweise auf die *in vivo* Funktion von *DegP* und den in dieser Arbeit erzeugten *DegP*-Derivaten zu erhalten, wurde untersucht, ob die entsprechenden Proteine den temperatursensitiven Phänotyp komplementieren. Dazu wurde der *E. coli*-Stamm KU98 (*degP*⁻) mit dem entsprechenden Plasmid, das *degP* bzw. *degP*-Derivate enthielt, über Nacht in Selektivmedium angezogen und am nächsten Morgen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Ausgehend davon wurden 1:10 Verdünnungen bis 10⁻⁷ angelegt und je 2 µl auf NZA-Agarplatten mit einer IPTG-Konzentration von 1 µM aufgetropft. Es folgte eine Inkubation für 16 h bei 43°C.

3.15.14 Herstellung und Inkubation von Peptidbibliotheken

Für die Selektion von an PDZ-Domänen bindenden Peptiden, die freie C-Termini voraussetzt, konnte nicht die standardisierte SPOT-Synthese mit der C-terminalen Fixierung der Peptide durchgeführt werden (Frank, 2002). Daher wurde die Methode der invertierten Peptide nach Boisguerin *et al.* angewendet, die Peptide mit freien C-Termini erzeugt (Boisguerin *et al.*, 2007). Dazu wurde eine Zellulosemembran (Whatman, 19 x 29 cm) verwendet, die nach der Peptidsynthese mit A. dest., Ethanol, TBS und abschließend mit Ethanol gewaschen wurde. Anschließend wurde die Membran getrocknet und bis zur Inkubation bei -20°C gelagert.

Nach dem Auftauen wurde die Membran mit Ethanol (10 min) und anschließend mit Puffer (3 x 10 min mit 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) gewaschen. Danach wurde die Membran 3 h in Deg-Blockingreagenz (Sigma-Aldrich, München) mit 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0 und anschließend über Nacht bei 4°C in Deg-Blockingreagenz mit 10 µg/ml DegP inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran in 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0 (3 x 10 min) gewaschen, 20 Minuten mit dem Erstantikörper (Rabbit-anti-DegP-MBP, polyklonal 1:20000) inkubiert, erneut gewaschen (3 x 10 min mit 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0), mit dem Zweitkörper inkubiert (Anti-rabbit IgG-HRP, Sigma, 1:4000) und abschließend gewaschen (3 x 10 min mit 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0). Zur Detektion wurde das West Pico Chemiluminescence Substrat-Kit (Pierce Biotechnology) benutzt.

TBS

Tris-HCl; pH 7,5	30 mM
NaCl	150 mM

3.15.15 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Zur Bestimmung thermodynamischer Charakteristika der Bindung zwischen DegP bzw. DegP-Derivaten und verschiedenen Peptiden wurde die Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) durchgeführt. Bei der ITC wird der Ligand kontinuierlich dem Protein hinzutitriert und die Wärmeentstehung gemessen. Anhand dieser Größe können Enthalpie, Entropie und Dissoziationskonstante einer Bindung bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde ein VP-ITC Mikrokalorimeter der Firma MicroCal verwendet. Das Protein (20 bis 40 µM) und das jeweilige Peptid (0,5 bis 1,5 mM) wurden für die Messungen im identischen Puffer gelöst und für 15 min entgast (Thermovac sample degasser, Microcal). Es wurden 1,4 ml Protein- und 0,3 ml Peptidlösung eingesetzt. Die Reaktionstemperatur betrug 37°C. Jeweils 5 µl Peptid wurden in 7,1 sec zu dem Protein titriert, wobei eine Equilibrierungszeit von 240 sec und eine Rührgeschwindigkeit von 394 rpm gewählt wurde. Zur Herstellung einer Referenzkurve wurde die Peptidlösung zu dem verwendeten Puffer ohne Protein titriert. Die Daten wurden anschließend mit der Origin Software ausgewertet und gegen die Wärmeentstehung der Referenzkurve korrigiert.

4 Ergebnisse

4.1 Die allosterischen Aktivierung der Protease DegP aus *E. coli*

DegP kann in seiner Proteaseaktivität allosterisch aktiviert werden (Krojer *et al.*, 2008a; Krojer *et al.*, 2008b, Meltzer *et al.*, 2008; Meltzer, 2008). Dabei ist die Aktivierung reversibel und geht einher mit einer Veränderung des oligomeren Zustandes vom Hexamer zum 12mer und 24mer. Um neue Einblicke in den Mechanismus der Aktivierung zu erhalten, wurde DegP in diesem Zusammenhang genauer untersucht.

4.1.1 Reinigung von DegP und DegP_{S210A}

DegP ist an der Assemblierung des Außenmembranproteins OmpC beteiligt und liegt bei der Reinigung aus einem *degP* *E. coli*-Stamm mit OmpC verunreinigt vor (Sklar *et al.*, 2007; Meltzer, 2008). Um dies zu umgehen wurde DegP aus dem *degP*⁻/*ompC*⁻-Stamm MA001 gereinigt. Die Überexpression des Proteins erfolgte von dem Plasmid pCS20. Nach der Reinigung wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Neben einer Bande, die einem Molekulargewicht von 48 kDa und somit DegP entspricht, konnte eine weitere Proteinbande detektiert werden, die einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa entsprach. Dabei handelt es sich um eine Doppelbande, die Produkte der Autoproteolyse von DegP darstellt (Lipinska *et al.*, 1990; Skórko-Glonek *et al.*, 1995). Der Reinheitsgrad des Proteins betrug >95% und die Ausbeute lag bei etwa 5 mg pro Liter Flüssigkultur.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollten Bindungsstudien und Oligomerisierungsanalysen mit DegP durchgeführt werden. Da die Autoproteolyse von DegP bei diesen Analysen zu Störsignalen führen kann, wurde auch die proteolytisch inaktive Mutante DegP_{S210A}, ausgehend von dem Plasmid pCS21, gereinigt. Von den einzelnen Reinigungsschritten wurden Proben entnommen und auf einem Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassieblau-Färbung analysiert (siehe Abb. 4-1). Nach abgeschlossener Reinigung lag DegP_{S210A} zu >95% rein vor und die Ausbeute betrug 10 mg pro Liter Flüssigkultur. Außerdem wurde die Reinigung durch eine Western Blot-Analyse mit dem Antikörper Anti-DegP verifiziert (siehe Abb. 4-1).

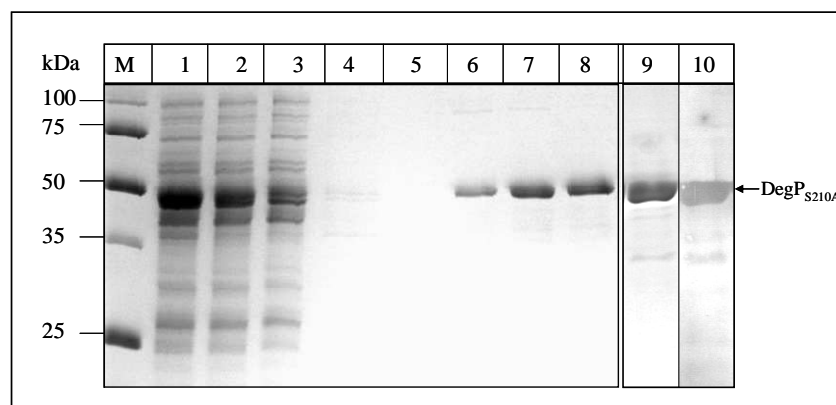


Abb. 4-1: Reinigung des Proteins DegP_{S210A}

Die Reinigung von DegP_{S210A} wurde unter nativen Konditionen über Ni-TED-Säulen durchgeführt. Der Nachweis erfolgte über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blau Färbung und über eine Western Immunoblotanalyse mit Anti-DegP als primärem Antikörper.

M: Proteinmarker, 1-9: Coomassie-Blau-Färbung; 1: Durchfluss der nicht gebundenen Proteine; 2: erster Waschschrift mit Lysepuffer; 3: zweiter Waschschrift mit Lysepuffer; 4: erster Waschschrift mit Lysepuffer + 1 M NaCl; 5: zweiter Waschschrift mit Lysepuffer + 1 M NaCl; 6: erster Elutionsschritt mit Elutionspuffer; 7: zweiter Elutionsschritt mit Elutionspuffer; 8: dritter Elutionsschritt mit Elutionspuffer; 9: DegP_{S210A} nach dem Aufkonzentrieren und Umpuffern in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 10: Western Blot: DegP_{S210A} nach dem Aufkonzentrieren und Umpuffern in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8,0.

4.1.2 Die allosterische Aktivierung von DegP im pNA-Enzymtest

In vorangegangenen Arbeiten wurden erste para-Nitroanilin (pNA) basierte Substrate, die dem quantitativen Nachweis der Proteaseaktivität von DegP dienen, entwickelt (Meltzer, 2008; Hauske *et al.*, 2009). Dabei handelt es sich zum einen um das Substrat SPMFKGV-pNA und zum anderen um das optimierte Substrat DPMFKLV-pNA. Außerdem wurde gezeigt, dass Peptide mit der Konsensussequenz DNRDGNVYXF DegP allosterisch aktivieren und dass diese Aktivierung reversibel ist (Meltzer, 2008). Das Peptid DNRDGNVYFF stellte mit einem höchstmöglichen Aktivierungsfaktor von 2,5 das beste Aktivatorpeptid dar. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die proteolytische Aktivität von DegP auch durch die Inkubation mit β -Caseinfragmenten (v β -Casein) oder mit intaktem β -Casein erhöht wird (Meltzer, 2008). Auffällig war in diesem Zusammenhang, dass die Aktivierung im pNA-Enzymtest mit dem Substrat SPMFKGV-pNA, verglichen zu Tests mit dem optimierten Substrat DPMFKLV-pNA, wesentlich stärker war. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass das Substrat DPMFKLV-pNA nach Abspaltung der para-Nitroanilingruppe selbst als Aktivatorpeptid dient (Meltzer, 2008).

Um die allosterische Aktivierung der Proteaseaktivität von DegP in dieser Arbeit genauer zu untersuchen, wurden pNA-Enzymtests mit dem Substrat SPMFKGV-pNA und dem optimierten Substrat DPMFKLV-pNA durchgeführt. Unter nicht aktivierenden Bedingungen wies DegP eine spezifische Aktivität von $15 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (SPMFKGV-pNA) bzw.

1400 nmol x mg⁻¹ x min⁻¹ (DPMFKLV-pNA) auf. Um DPMFKLV als putativen DegP-Aktivator zu untersuchen, wurden Aktivitätstests mit dem Substrat SPMFKGV-pNA und diesem Peptid durchgeführt. Vergleichend dazu wurde das Peptid SPMFKGV sowie die bereits bekannten allosterischen Aktivatoren DNRDGNVYFF, β -Casein und $\nu\beta$ -Casein im Enzymtest eingesetzt. Die Enzymtests wurden quantifiziert und auf die Probe ohne Aktivatorpeptid normiert (siehe Abb. 4-2).

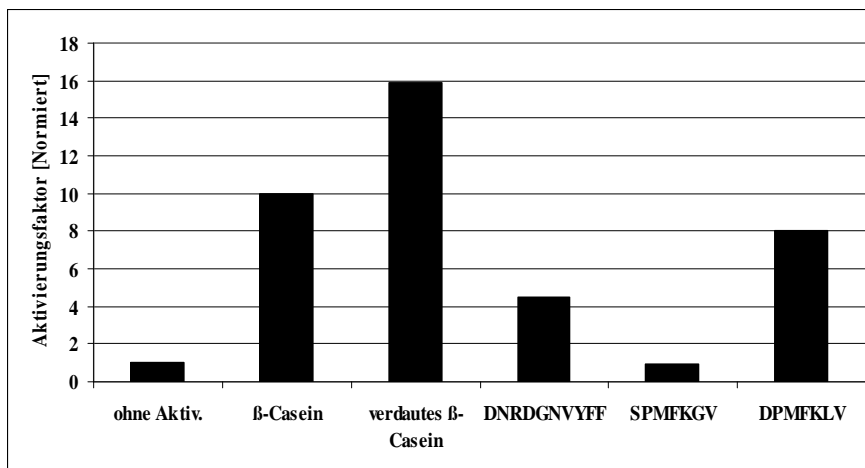


Abb. 4-2: Aktivierung von DegP im Enzymtest mit SPMFKGV-pNA als Substrat

Dargestellt ist die Aktivierung von DegP über verschiedene Peptide und Proteine im pNA-Enzymtest mit dem Substrat SPMFKGV-pNA. Für die Enzymtests wurde jeweils 1 μ M DegP mit einem der putativen Aktivatoren (100 μ M DNRDGNVYFF, 6 μ M (10 μ g) β -Casein, 5 μ g $\nu\beta$ -Casein, 100 μ M SPMFKGV oder 100 μ M DPMFKLV) für 5 min im Reaktionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden 0,5 mM des Substrats zugegeben und die Absorption bei 405 nm für 1 h bei 37°C gemessen. Aus den ermittelten Werten wurde die spezifische Aktivität berechnet und diese auf die Aktivität der Proteinprobe ohne Aktivator normiert. Eine Aktivierung von 1 entspricht einer spezifischen Aktivität von 15 nmol x mg⁻¹ x min⁻¹. Die Standardabweichung lag unter 20%.

Während die Zugabe des Peptids DNRDGNVYFF in einer Konzentration von 100 μ M zu einer DegP-Aktivierung um einen Faktor von 4,5 führte, resultierte die Zugabe von β -Casein bzw. $\nu\beta$ -Casein in einer 10 bzw. 16 fachen Aktivierung. Das Peptid SPMFKGV aktivierte DegP hingegen nicht. Wie in Abb. 4-2 dargestellt, führte die Inkubation von DegP mit dem Peptid DPMFKLV in einer Konzentration von 100 μ M zu einer 8-fachen Aktivierung. DPMFKLV stellt somit einen DegP-Aktivator dar, der zu einer stärkeren Aktivierung führt als die bereits bekannten Aktivatorpeptide mit der Konsensussequenz DNRDGNVYXF.

4.1.3 Validierung der Bindung von Aktivatoren an DegP mittels ITC

Um die Bindung der identifizierten Aktivatoren an DegP zu validieren, wurden Bindungsstudien mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine biophysikalische Messtechnik, die Aufschluss über thermodynamische Charakteristika der Bindung zwischen Ligand und Makromolekül gibt (siehe 3.15.15). In dieser Arbeit war die Ermittlung der Bindungsaffinitäten (K_d) zwischen DegP und seinen Aktivatoren von besonderem Interesse. Diese sollten Aufschluss darüber geben, ob die Stärke der Aktivierung mit der Stärke der Bindung der Peptide an DegP korreliert.

Da die Autoproteolyse von DegP als chemische Reaktion zu Störsignalen in der ITC führt, wurde mit der proteolytisch inaktiven Mutante DegP_{S210A} gearbeitet. Neben β -Casein wurden die bekannten Aktivatorpeptide mit der Konsensussequenz DNRDGNVYXF und den C-Termini -YFF, -YLF, -YSF, -YWF und -YQF getestet. Außerdem wurden die Peptide SPMFKGV und DPMFKLV eingesetzt. Es wurden keine Messungen mit $\nu\beta$ -Casein durchgeführt, da dieses ein Gemisch aus verschiedenen Peptiden darstellt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit mit verschiedenen Affinitäten an DegP_{S210A} binden.

In den ITC-Messungen wurden 20 μ M DegP_{S210A} eingesetzt und die Konzentrationen der Liganden je nach Löslichkeit und Stärke der Bindung variiert. Die erhaltenen Daten konnten nach dem Modell „one set of sites“ ausgewertet werden. Anschließend wurden die auf diese Weise ermittelten Bindungsaffinitäten mit den im pNA-Enzymtest (mit dem Substrat SPMFKGV-pNA) ermittelten Aktivierungsfaktoren verglichen (siehe Tab. 4-1) Abb. 4-3 zeigt beispielhaft die ITC-Kurven von DegP mit β -Casein, DNRDGNVYFF, DPMFKLV und SPMFKGV.

Es wurden Dissoziationskonstanten (K_d s) von 4,98 bis 32,68 μ M ermittelt (siehe Tab. 4-1). Der schwache Aktivator DNRDGNVYSF mit einem Aktivierungsfaktor von 1,4 zeigte keine signifikante Bindung an DegP_{S210A}. Signifikante Bindungen können in der ITC bis zu einer K_d von etwa 150 μ M detektiert werden. Auch das Peptid SPMFKGV, das DegP nicht aktiviert, bindet nicht signifikant an DegP_{S210A}. Die K_d s der Aktivatorpeptide mit der Konsensussequenz DNRDGNVYXF und den C-Termini -YFF, -YLF, -YWF und -YQF variierten und lagen zwischen 7,75 und 32,68 μ M. Auffällig war, dass der schwache Aktivator DNRDGNVYWF mit einer K_d von 7,75 μ M relativ stark an DegP gebunden hatte. Der neu identifizierte Aktivator DPMFKLV zeigte mit einer K_d von 4,98 μ M eine starke

Bindung an DegP_{S210A}. Diese war vergleichbar mit der Bindung von β -Casein an DegP_{S210A} ($K_d = 3,75 \mu\text{M}$).

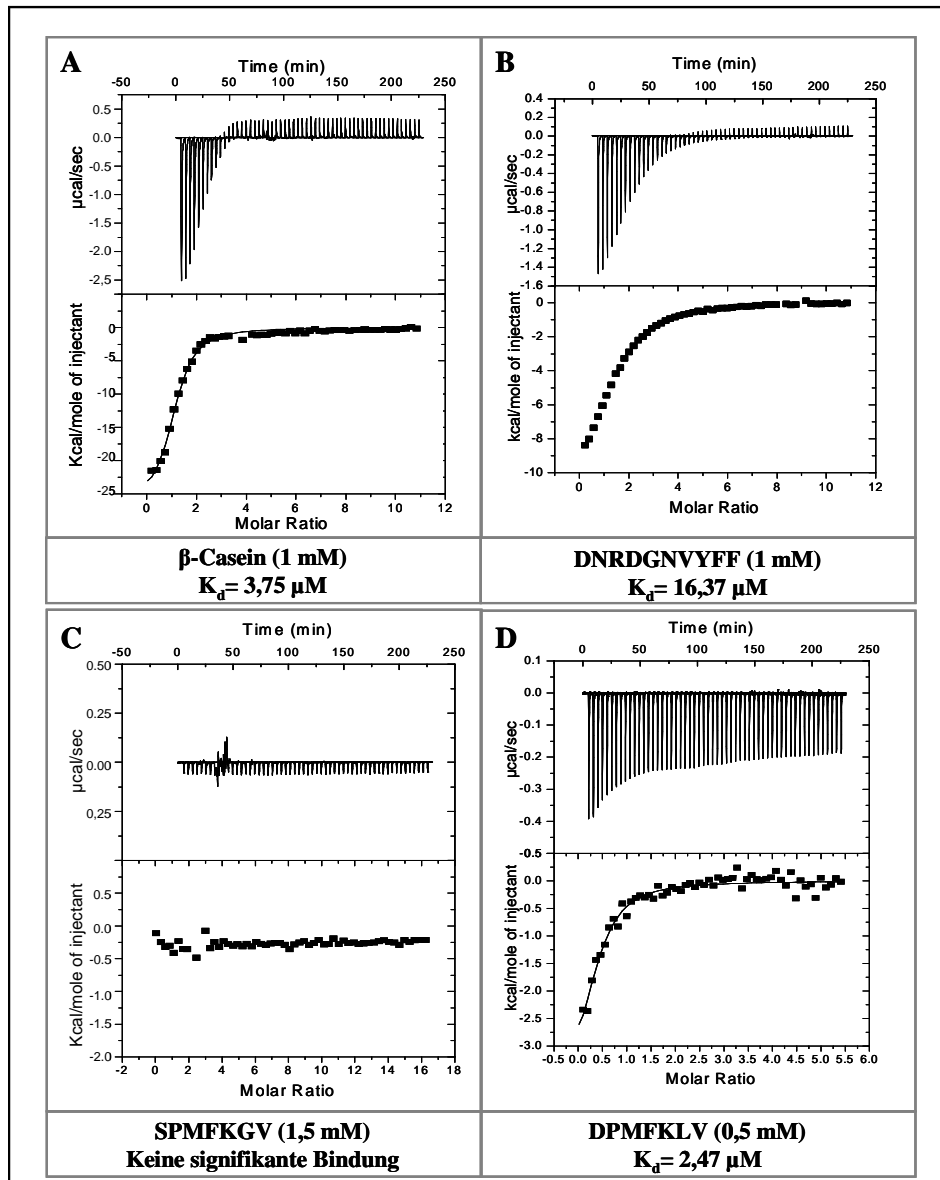


Abb. 4-3: ITC mit DegP_{S210A}

Die Bestimmung der Bindekonstanten von verschiedenen Liganden an DegP_{S210A} wurde mittels ITC bei 37°C durchgeführt. Dazu wurden Ligand und DegP_{S210A} in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8,0 gelöst. Während DegP_{S210A} 20 μM eingesetzt wurde, variierte die Konzentration des Liganden je nach Stärke der Bindung. Die eingesetzten Konzentrationen des Liganden sowie die ermittelten Bindekonstanten (K_d) sind in der Abbildung dargestellt. Die Daten wurden nach dem Modell „one set of sites“ gefittet. A: DegP_{S210A} (20 μM) mit β -Casein (1mM); B: DegP_{S210A} (20 μM) mit DNRDGNVYFF (1mM); C: DegP_{S210A} (20 μM) mit SPMFKGV (1,5 mM); D: DegP_{S210A} (20 μM) mit DPMFKLV (0,5 mM).

Tab. 4-1: Bindungsaffinitäten zwischen putativen Liganden und DegP_{S210A}

Die Bestimmung der Bindekonstanten von verschiedenen Liganden an DegP_{S210A} wurde mittels ITC bei 37°C durchgeführt. Dazu wurden Ligand und DegP_{S210A} in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8 gelöst. Während DegP_{S210A} 20 µM eingesetzt wurde, variierte die Konzentration des Liganden je nach Stärke der Bindung. Die Daten wurden nach dem Modell „one set of sites“ gefittet und die ermittelten Bindekonstanten (K_d) sind in der Tabelle dargestellt. Zusätzlich ist der jeweilige Aktivierungsfaktor der Liganden im pNA-Enzymtest, normiert auf den DegP-Wildtyp (4.1.2), aufgeführt. -: keine signifikante Bindung bzw. keine Aktivierung; ^a 1 entspricht einer spezifischen Aktivität von 15 nmol x mg⁻¹ x min⁻¹; ^b Die Werte wurden von Dr. Michael Meltzer bestimmt.

Ligand	K_d [µM]	x-fache-Aktivierung [Normiert] ^a
β-Casein	3,75	10,0
DPMFKLV	4,98	8,0
DNRDGNVYWF	7,75	1,95 ^b
DNRDGNVYFF	16,37	4,5
DNRDGNVYQF	25,64	1,5 ^b
DNRDGNVYLF	32,68	1,6 ^b
DNRDGNVYSF	-	1,4 ^b
SPMFKGV	-	-

DegP ist in der Zelle an der Assemblierung von Außenmembranproteinen beteiligt. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass diese trotz mehrerer Reinigungsschritte an DegP gebunden vorliegen (Sklar *et al.*, 2007; Krojer *et al.*, 2008a). Um auszuschließen, dass an DegP_{S210A} gebundene Liganden die ITC-Ergebnisse verfälschen, wurden Messungen mit rückgefaltetem DegP_{S210A} durchgeführt. Dazu wurde DegP chemisch in 8 M Harnstoff denaturiert und anschließend durch Verdünnung rückgefaltet. Eventuell gebundene Liganden sollten dadurch von DegP entfernt werden.

Das rückgefaltete DegP_{S210A} wurde in Messungen mit β-Casein, SPMFKGV und DPMFKLV eingesetzt und die erhaltenen Daten mit denen aus den vorherigen Versuchen mit nicht rückgefaltetem DegP_{S210A} verglichen (siehe Tab. 4-2).

Zwischen dem rückgefalteten DegP_{S210A} und dem Peptid SPMFKGV konnte keine signifikante Bindung detektiert werden. Sowohl β-Casein als auch DPMFKLV zeigten eine im Vergleich zur Bindung an nicht rückgefaltetes Protein etwas stärkere Bindung an rückgefaltetes DegP_{S210A}. Allerdings lagen die K_d s mit Werten von 1,75 µM im Vergleich zu 3,75 µM und 2,47 µM im Vergleich zu 4,98 µM nahe beieinander. Da sich die Werte durch das Rückfalten von DegP_{S210A} in der Tendenz nicht veränderten, wurde in weiteren Versuchen mit nicht rückgefaltetem DegP_{S210A} weitergearbeitet.

Tab. 4-2: Bindungsaffinitäten zwischen Liganden und DegP_{S210A} und rückgefaltetem DegP_{S210A}

Die Bestimmung der Bindekonstanten von verschiedenen Liganden an DegP_{S210A} und an rückgefaltetes DegP_{S210A} wurde mittels ITC bei 37°C durchgeführt. Dazu wurden Ligand und Protein in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8 gelöst. Während das Protein 20 µM eingesetzt wurde, variierte die Konzentration des Liganden je nach Stärke der Bindung. Die Daten wurden nach dem Modell „one set of sites“ gefittet und die ermittelten Bindekonstanten (K_d) sind in der Tabelle dargestellt. -: keine signifikante Bindung.

Protein	Ligand	K_d [µM]
DegP _{S210A}	β-Casein	3,75
DegP _{S210A} rückgefaltet	β-Casein	1,75
DegP _{S210A}	SPMFGKV	-
DegP _{S210A} rückgefaltet	SPMFGKV	-
DegP _{S210A}	DPMFKLV	4,98
DegP _{S210A} rückgefaltet	DPMFKLV	2,47

Um den Einfluss der Temperatur auf die Bindung von Liganden an DegP zu untersuchen, wurden repräsentativ ITC-Messungen mit DegP_{S210A} und β-Casein bei 28, 37 und 43°C durchgeführt. Es wurden K_d s von 2,43 µM bei 28°C, 1,75 µM bei 37°C und 1,22 µM bei 43°C bestimmt. Die Werte zeigen, dass β-Casein mit steigender Temperatur stärker an DegP_{S210A} bindet, wobei sich die Werte nicht um ein Vielfaches voneinander unterscheiden. Weitere ITC-Messungen im Verlauf dieser Arbeit wurden daher ausschließlich bei 37°C durchgeführt.

4.1.4 Die Oligomerisierung von DegP

4.1.4.1 Der Effekt von Aktivatoren auf den oligomeren Zustand von DegP

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass DegP über die Bindung von Aktivatoren in seiner Proteaseaktivität aktiviert wird. Die Stärke der Aktivierung hängt dabei mit der Stärke der Bindung der Aktivatoren an DegP zusammen. Vorangegangene Studien haben beschrieben, dass die DegP-Aktivierung einhergeht mit einer Verschiebung des oligomeren Zustandes vom Hexamer zum 12mer und 24mer, wobei die höheren Oligomere eine erhöhte proteolytische Aktivität aufweisen (Meltzer, 2008; Krojer *et al.*, 2008a). Um den Mechanismus der Aktivierung im Hinblick auf die Veränderung des oligomeren Zustandes mit verschiedenen Aktivatoren genauer zu untersuchen, wurden Cross-Link Untersuchungen durchgeführt. Die Cross-Link Methode gibt Aufschluss über den oligomeren Zustand eines Proteins, wobei verschiedene Oligomere gleichzeitig detektiert werden können (siehe 3.15.10.2). Zur Etablierung der Methode wurden verschiedene Cross-Linker, Pufferbedingungen, Inkubationszeiten und Proteinkonzentrationen getestet (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde die proteolytisch inaktive Mutante DegP_{S210A} verwendet, um die Autoproteolyse von DegP und

die damit eventuell auftretende Interferenz von Abbaufragmenten und Veränderungen im oligomeren Zustand zu verhindern. Die optimale Konzentration von DegP_{S210A} betrug 0,6 μ M. Das Protein wurde für 5 min mit verschiedenen Konzentrationen des zu testenden Aktivators bei 37°C inkubiert, der Cross-Linker Glutaraldehyd in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) dazugegeben und die Reaktion nach 2 min gestoppt (siehe Abb. 4-4). In Abwesenheit von Aktivatoren lag DegP_{S210A} hauptsächlich als Hexamer, Trimer und Monomer vor. Die Zugabe von 3-5% DMSO, das in dieser Konzentration als Lösungsmittel einiger Aktivatoren eingesetzt wurde, führte zu keiner signifikanten Veränderung. Als Aktivatoren wurden ν β -Casein, DNRDGNVYFF, SPMFKGV und DPMFKLV in verschiedenen Konzentrationen getestet (siehe Abb. 4-4).

Die Addition von ν β -Casein führte zu einer starken Abnahme des Hexamers, Trimers und Monomers und zum vermehrten Auftreten des 12mers und 24mers. Das Aktivatorpeptid DPMFKLV induzierte schon bei einer eingesetzten Menge von 100 μ M einen kompletten Switch zum 24mer. Dahingegen führte das Peptid SPMFKGV bis zu einer eingesetzten Konzentration von 2,5 mM nicht zu der Ausbildung höherer Oligomere. Bei zunehmenden Aktivatorkonzentrationen konnte allerdings eine leichte Abnahme trimerer und dimerer Strukturen und eine leichte Zunahme hexamerer Strukturen beobachtet werden. Der schwache DegP-Aktivator DNRDGNVYFF induzierte einen nur marginalen Switch vom Hexamer zum 12 mer bei einer eingesetzten Konzentration von mindestens 0,6 mM. Auffällig war, dass die schrittweise Zunahme der Aktivatorkonzentration deutlich zu einer Abnahme der Trimere, Dimere und Monomere und zu einer Zunahme des Hexamers führte.

Die ermittelten Daten korrelieren mit den Ergebnissen der Bindungs- und der Aktivierungsstudien und untermauern die Hypothese, dass die allosterische Aktivierung von DegP einhergeht mit der Veränderung des oligomeren Zustandes hin zum 12 und 24mer. Unter den Aktivatorpeptiden konnte das Peptid DPMFKLV als stärkster Aktivator identifiziert werden. Es bindet mit einer K_d von 4,98 μ M an DegP_{S210A}, aktiviert DegP 8 fach in der Proteaseaktivität und induziert einen vollständigen Shift vom Hexamer zum 24mer bereits bei einer geringen eingesetzten Konzentration von 100 μ M. Aufgrund dieser Ergebnisse und der relativ guten Löslichkeit wurde dieses Peptid vorrangig in weiteren Oligomerisierungsanalysen und vergleichenden Bindungsstudien eingesetzt.

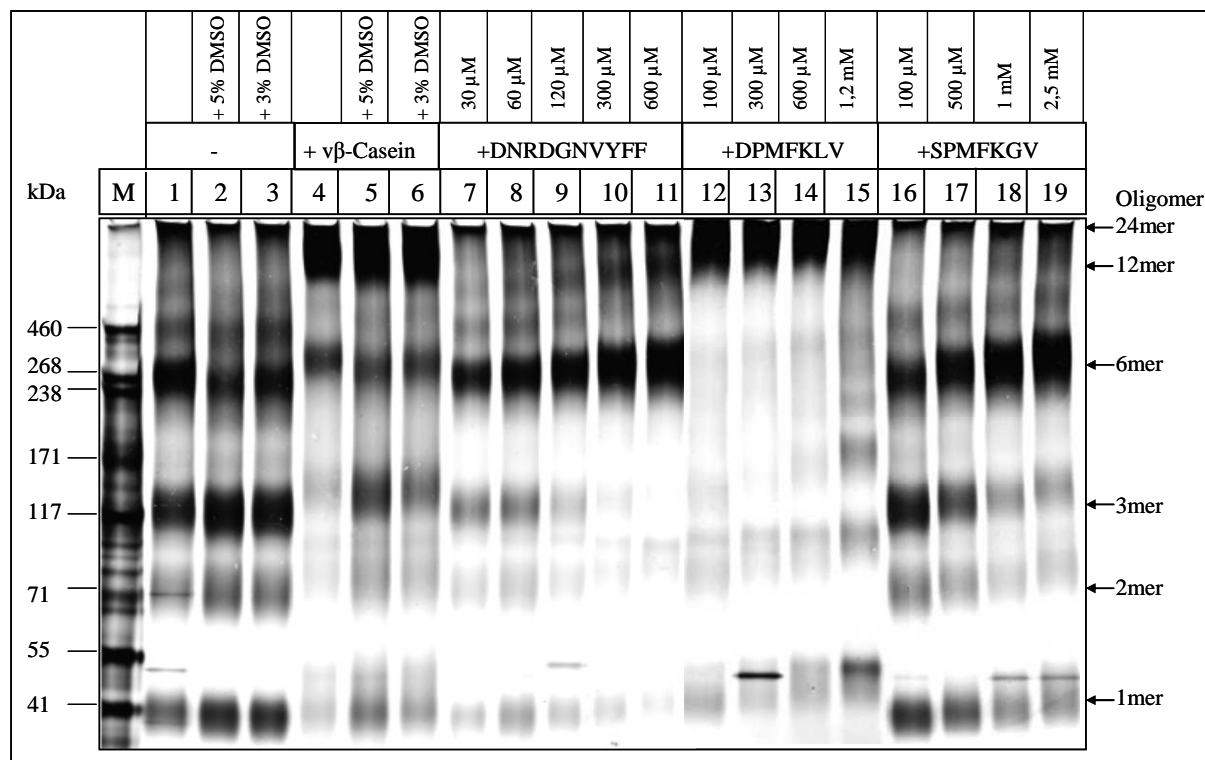


Abb. 4-4: Cross-Links von DegP_{S210A} mit verschiedenen Aktivatoren

DegP_{S210A} wurde chemisch denaturiert und rückgefaltet. Anschließend wurden 0,6 μ M des Proteins mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Aktivators (von v β -Casein wurden 5 μ g eingesetzt) für 5 Minuten bei 37°C im Reaktionspuffer (100 mM NaH₂PO₄ pH 8,0) inkubiert. Der Cross-Linker Glutaraldehyd wurde in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) dazugegeben und die Reaktion nach weiteren 2 min durch die Zugabe von Tris-HCl pH 7,5 (Endkonzentration 200 mM) gestoppt. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und etwa 133 ng/Spur auf ein Tris-Acetat-Gel (3-8%) aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde eine Silberfärbung durchgeführt. M: NuPAGE Novex Proteinmarker.

4.1.4.2 Der Effekt der Temperatur auf den oligomeren Zustand von DegP

DegP ist ein Hitzeschockprotein, das temperaturreguliert ist und dessen Proteaseaktivität bei höheren Temperaturen ausgeprägter ist (Spiess et al., 1999). Um den Effekt verschiedener Temperaturen auf den oligomeren Zustand von DegP zu untersuchen, wurden Cross-Link Experimente nach dem Rückfalten von denaturiertem DegP_{S210A} mit und ohne v β -Casein bei 28, 37 und 43°C durchgeführt. Nach der Rückfaltung wurde der Crosslinker Glutaraldehyd zu verschiedenen Zeitpunkten von 10 sec bis 10 min dazugegeben (siehe Abb. 4-5). Als Kontrolle wurde v β -Casein ohne DegP_{S210A} betrachtet (siehe Abb. 4-5).

In Abwesenheit von v β -Casein lag DegP_{S210A} bei 28°C nach 10 sec hauptsächlich als Monomer vor. Bereits nach 10 min lag ein Großteil als Hexamer vor. Die Untersuchungen bei 37°C zeigten ähnliche Ergebnisse, wobei DegP_{S210A} bereits nach 10 sec Inkubationszeit vermehrt als Hexamer vorlag. Bei 43°C konnten im Vergleich zu den Versuchen bei niedrigeren Temperaturen vermehrt DegP_{S210A}-Trimere detektiert werden. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass DegP-Hexamere bei höheren Temperaturen destabilisiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Zugabe von $v\beta$ -Casein bei der Rückfaltung von DegP_{S210A} führte bei allen getesteten Temperaturen zu einem schnelleren Switch der Monomere, Dimere und Trimere zu Hexameren. Bei 37°C und 43°C lag DegP_{S210A} bereits nach 10 sec vollständig als Hexamer vor. Bei 28°C konnte zwar ein Switch zum 24mer beobachtet werden, allerdings lag DegP_{S210A} auch nach 10 min noch zu einem kleinen Teil als Hexamer vor. Die Daten zeigen, dass der Switch vom Hexamer zu höheren proteolytisch aktiveren Oligomeren temperaturabhängig ist. Die Daten aus den ITC-Experimenten zeigen, dass die Unterschiede in den Bindungsaffinitäten von β -Casein an DegP_{S210A} bei verschiedenen Temperaturen sehr gering sind und vermutlich nicht der Grund für den hier detektierten Temperatureffekt sind (siehe 4.1.3).

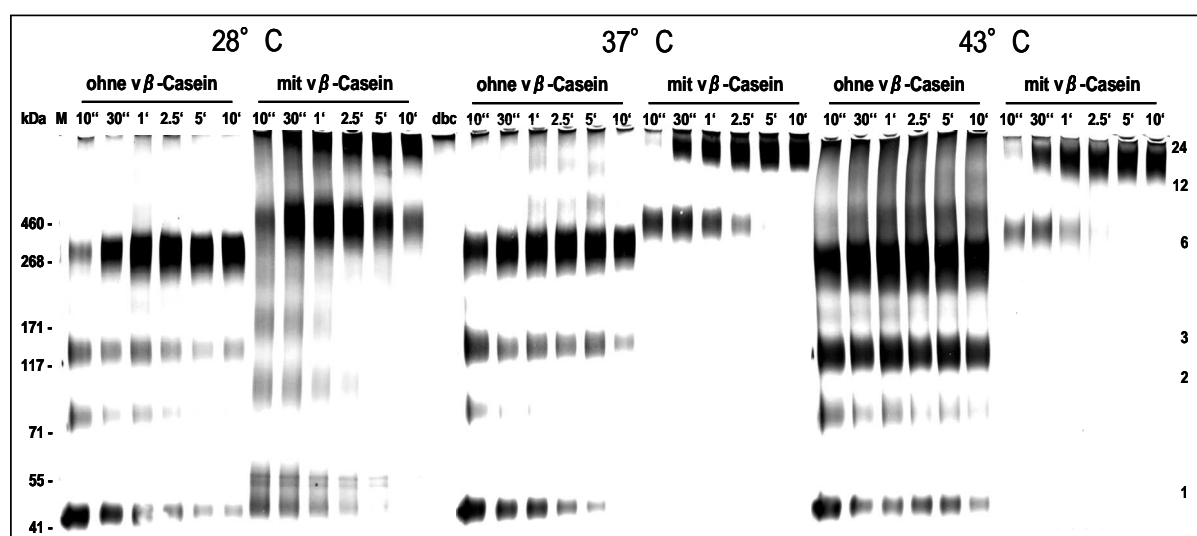


Abb. 4-5: Der Effekt der Temperatur auf den oligomeren Zustand von DegP_{S210A}

DegP_{S210A} wurde chemisch denaturiert und mit und ohne β -Casein rückgefaltet. Der Cross-Linker Glutaraldehyd wurde in einer Endkonzentration von 0,2% (v/v) für 1 min zu verschiedenen Zeitpunkten dazugegeben und die Reaktion nach weiteren 2 min durch die Zugabe von Tris-HCl pH 7,5 (Endkonzentration 200 mM) gestoppt. Die Experimente wurden bei 28°C, 37°C und 43°C durchgeführt. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und etwa 133 ng/Spur auf ein Tris-Acetat-Gel (3-8%) aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde eine Silberfärbung durchgeführt.

4.1.5 Identifizierung neuer DegP-Aktivatoren

Neben der Charakterisierung des Effekts bereits bekannter Aktivatoren auf DegP war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, neue DegP-Aktivatoren zu identifizieren. Diese können Aufschluss geben über die *in vivo* Funktion von DegP oder als Grundlage für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren dienen.

4.1.5.1 Screening einer DegP-Peptidbibliothek

Zur Identifizierung neuer Aktivatoren von DegP wurde eine DegP-Peptidbibliothek in Kooperation mit Prof. Volkmer der Charité in Berlin hergestellt und diese anschließend gescreent². Da erwartet wurde, dass DegP über seine PDZ-Domäne 1 die C-Termini seiner Aktivatoren bindet, wurde die Methode der invertierten Peptide, bei der es sich um eine modifizierte SPOT-Synthese handelt, zur Herstellung der Peptidbibliothek gewählt (siehe 3.15.14). Auf diese Weise wurden Peptide mit freien C-Termini auf einer Zellulosemembran synthetisiert (Boisguerin *et al.*, 2007). Bei der so hergestellten Peptidbibliothek handelte es sich um eine nicht redundante Bibliothek, die aus 649 C-Termini (10mere) von *E. coli* Zellhüllproteinen bestand (EcoBib). Für das Screening wurde die EcoBib mit DegP inkubiert und an Peptid gebundenes DegP über Antikörper detektiert. Es konnten 30 positive Signale identifiziert werden (siehe Abb. 4-6). Das stärkste Signal (48,266 BLU) wurde für den C-Terminus des Außenmembranproteins OmpP mit der Sequenz ITTAGLKYTF bestimmt. Während ein mittel starkes Signal (29,434 BLU) für die periplasmatische β -Glucosidase BglX mit der C-terminalen Sequenz RVKGEFELL bestimmt wurde, zeigte die Bindung von DegP an das uncharakterisierte Protein YecR mit dem C-Terminus CHHSAFPVL ein eher schwaches Signal (19,492 BLU). Eine Auflistung aller an DegP bindenden Peptide ist im Anhang dargestellt (siehe Tab. 7-1). Aus den Sequenzen der 30 positiv getesteten Peptide wurde ein Bindemotiv ermittelt, das die Präferenz für verschiedene Aminosäuren an verschiedenen Positionen der gebundenen Peptide darstellt (siehe Abb. 4-6). Es konnte eine Präferenz für hydrophobe (L/A/V/I) und aromatische Aminosäuren (F) an der Position 0 festgestellt werden. An der Position -1 konnte eine Präferenz für Leucin, Arginin und Threonin detektiert werden. Sowohl Tyrosin als auch Glutamat und Leucin kamen häufig an Position -2 vor. Eine signifikante Präferenz konnte an den anderen Positionen nicht festgestellt werden.

² Die Herstellung der Peptidbibliothek sowie das Screening wurden von Eike Wolter, Institut für Medizinische Immunologie, AG Volkmer „Molekulare Bibliotheken“ an der Charité Berlin durchgeführt.

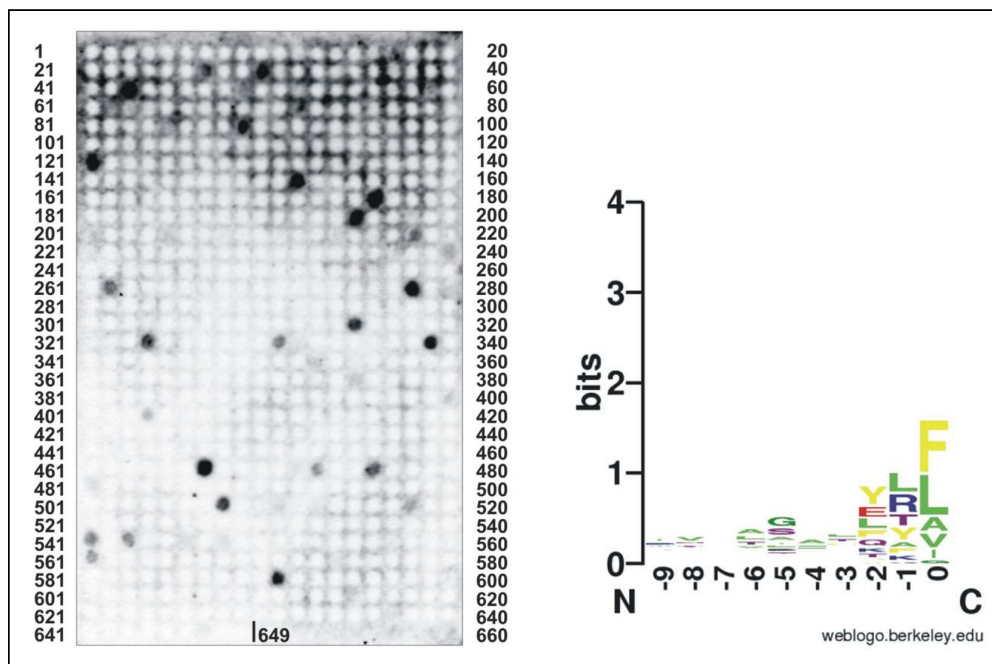


Abb. 4-6: Screening der *E. coli* Peptidbibliothek mit DegP²

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Screening der EcoBib mit DegP (links). Die EcoBib-Membran wurde über Nacht mit DegP (10 mg/ml) inkubiert und anschließend die Bindung an die Peptide detektiert. Dazu fand eine Inkubation mit dem anti-DegP-AK (1:20000) und anschließend mit dem Zweitantikörper goat anti-rabbit IgG-HRP (1:4000) statt. Die Intensität der Signale wurde in Böhlinger light units (BLU) mit dem Lumi Imager gemessen (Exposition 1 min, Lumi-Einstellungen 208/720). Anschließend wurde auf www.weblogo.berkeley.edu ein Profil der Sequenz von an DegP gebundenen Peptiden erstellt (rechts). Die Größe der dargestellten Buchstaben korreliert positiv mit der Frequenz der Aminosäure. Während die Farbe gelb auf aromatische Aminosäuren deutet, steht grün für hydrophobe Aminosäuren. Saure Aminosäuren werden durch blaue und rote Buchstaben dargestellt.

Zur Verifizierung der aus dem Screening der Peptidbibliothek erhobenen Daten wurden sechs putative Aktivatoren gewählt, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit genauer untersucht wurden (siehe Tab. 4-3). Es wurden sowohl sehr gut als auch schwächer bindende Peptide ausgewählt, um die Korrelation zwischen Bindung und Aktivierung zu prüfen.

Neben den sechs ausgewählten Peptiden wurden auch an DegS und HtrA1 bindende Peptide² getestet. Die bakterielle HtrA-Protease DegS und das humane HtrA1 sind Homologe von DegP. Es wurden drei an DegS bindende und zwei an HtrA1 bindende Peptide für eine weitere Charakterisierung mit DegP ausgewählt (siehe Tab. 4-3).

Tab. 4-3: Identifizierte an HtrA-Proteine bindende Peptide

Peptid	Protein	Bindung an	Sequenz	Bindung an DegP [BLU]
OMPP	Außenmembranprotein (<i>E. coli</i>)	DegS/DegP	ITTAGLKYTF	48,3
YDHR	Putative Monooxygenase (<i>E. coli</i>)	DegP	LSQINQAKLA	42,2
YCDB	Peroxidase (<i>E. coli</i>)	DegP	DYFGSALLRV	40,5
FHUA	Ferrichrom-Eisen -Rezeptor (<i>E. coli</i>)	DegS/DegP	QVVATATFRF	40,3
BGLX	periplasmatische β -Glucosidase (<i>E. coli</i>)	DegP	RVKKGEFELL	29,4
BTUB	Vitamin B12 Transporter (<i>E. coli</i>)	DegP	EYTLSGSYTF	28,6
YECR	uncharakterisiert (<i>E. coli</i>)	DegS/DegP	CHHSAFPVFL	19,4
YAIO	uncharakterisiert (<i>E. coli</i>)	DegS	QLAARLTWKF	-
FECA	Eisen(III)-Dicitrat-Transport-Protein (<i>E. coli</i>)	DegS	TLYMQGSLKF	-
MCM7	DNA-Replikation-Lizenzierungs-Faktor (<i>H. sapiens</i>)	HtrA1	VNASRTRITFV	-
REL	C-Rel Proto-Onkogen-Protein (<i>H. sapiens</i>)	HtrA1	DSFPYEFFQV	-

4.1.5.2 Aktivierung von DegP durch neu identifizierte Peptide

Um zu testen, ob die an DegP bindenden Peptide DegP auch aktivieren, wurden pNA-Enzymtests mit dem Substrat SPMFKGV-pNA mit und ohne die putativen Aktivatoren durchgeführt. Anschließend wurden die Enzymtests quantifiziert und auf die Probe ohne Aktivator normiert. Als Kontrolle dienten die bekannten Aktivatoren β -Casein und DNRDGNVYFF (YFF). Die ermittelten Aktivierungsfaktoren für die insgesamt 11 zu testenden Peptide lagen zwischen 1,6 (BGLX) und 14,1 (YCDB) (siehe Tab. 4-4). Dabei konnten die Peptide YECR und YCDB mit Aktivierungsfaktoren von 10,2 bzw. 14,1 als sehr starke Aktivatoren von DegP identifiziert werden. Tab. 4-4 zeigt neben den Aktivierungsfaktoren der einzelnen Peptide auch die Stärke der Bindung im Peptidbibliothek-Screening. Interessanterweise korrelierte die Stärke der Bindung nicht absolut mit den Aktivierungsfaktoren. So aktivierte das Peptid YECR DegP im pNA-Enzymtest überdurchschnittlich gut, zeigte aber im Screening eine sehr schwache Bindung an DegP. Dahingegen handelt es sich bei dem Peptid YDHR um einen sehr guten Binder, der DegP aber nur mit einem Faktor von 3,2 aktiviert. Auch bei anderen Peptiden wie zum Beispiel OMPP oder YAIO konnte die Korrelation zwischen Stärke der Aktivierung und Stärke der Bindung nicht absolut bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine etwas voneinander abweichende Konformation der Peptide sein, da diese zum einen frei in Lösung, zum anderen gebunden an eine Membran vorliegen.

Tab. 4-4: Aktivierungsfaktoren putativer Aktivatoren von DegP

Dargestellt sind die Aktivierungsfaktoren verschiedener Peptide und β -Casein, die im pNA-Enzymtest mit dem Substrat SPMFKGV-pNA ermittelt wurden. Für die Enzymtests wurde jeweils 1 μ M DegP mit einem der putativen Aktivatoren (100 μ M DNRDGNVYFF (YFF), 6 μ M (10 μ g) β -Casein, 100 μ M putative Aktivatoren aus dem Peptidbibliothek-Screening) für 5 min im Reaktionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden 0,5 mM des Substrats zugegeben und die Absorption bei 405 nm für 2 h bei 37°C gemessen. Aus den ermittelten Werten wurde die spezifische Aktivität berechnet und diese auf die Aktivität der Proteinprobe ohne Aktivator normiert. Die Standardabweichung lag unter 17%. Vergleichend sind die in dem Screening der Peptidbibliothek ermittelten Boehringer Light Units (BLU) der Bindung zwischen Peptid und DegP dargestellt (siehe 4.1.5.1). ^a 1 entspricht einer spezifischen Aktivität von 15 nmol x mg⁻¹ x min⁻¹.

Peptid	Sequenz	Bindung an DegP [BLU]	Aktivierungsfaktor [Normiert] ^a
OMPP	ITTAGLKYTF	48,3	5,5
YDHR	LSQINQAKLA	42,2	3,2
YCDB	DYFGSALLRV	40,5	14,1
FHUA	QVVATATFRF	40,3	4,4
BGLX	RVKKGEFELL	29,4	1,6
BTUB	EYTLSGSYTF	28,6	1,9
YECR	CHHSAFPVFL	19,4	10,2
YAIQ	QLAARLTWKF	-	4,8
FECA	TLYMQGSLKF	-	2,4
MCM7	VNASRTRITFV	-	2,8
REL	DSFPYEFFQV	-	1,9
YFF	DNRDGNVYFF	-	4,5
β -Casein	-	-	10,5

4.1.5.3 Validierung der Bindung der neu identifizierten an DegP bindenden Peptide mittels ITC

Bei dem Screening einer Peptidbibliothek mit anschließender Detektion über Antikörper handelt es sich um eine semiquantitative Methode. Um die Bindung der in 4.1.5.1 identifizierten Peptide an DegP quantitativ zu erfassen, sollten Bindungsstudien mittels ITC durchgeführt werden. Dazu wurde DegP_{S210A} 20 μ M eingesetzt und die Konzentrationen der zu testenden Peptide je nach Löslichkeit und Stärke der Bindung variiert. Da sich die Mehrzahl der Peptide nicht in den erforderlichen Konzentrationen im Reaktionspuffer lösen ließ, wurden die Messungen auf die zwei besten Aktivatoren YCDB und YECR sowie auf die zwei schlechteren Aktivatoren BTUB und BGLX beschränkt. Tab. 4-5 zeigt die ermittelten K_ds und vergleichend die im pNA-Enzymtest ermittelten Aktivierungsfaktoren. Außerdem sind zum Vergleich die Werte der bekannten Aktivatoren β -Casein und DNRDGNVYFF aufgelistet. Die ermittelten Bindekonstanten für die neu identifizierten Aktivatoren lagen zwischen 4,61 μ M und 75,76 μ M. Dabei zeigte das Peptid YCDB, das als bester Aktivator identifiziert wurde, mit einer K_d von 4,61 μ M die stärkste Bindungsaffinität zu DegP. YCDB bindet somit wesentlich stärker an DegP_{S210A} als das bereits bekannte Aktivatorpeptid

DNRDGNVYFF. Zwischen dem Peptid YECR, das als zweitbesten Aktivator identifiziert wurde, und DegP_{S210A} wurde eine K_d von 8,31 μM bestimmt. Bezüglich des eher schlechten Aktivators BGLX wurde eine schwache Bindungsaffinität mit einer K_d von 75,76 μM gemessen. Die Bindungsaffinität von BTUB mit einer K_d von 8,47 μM korrelierte hingegen nicht mit dem Aktivierungsfaktor, der mit 1,9 relativ gering war.

Tab. 4-5: Dissoziationskonstanten neu identifizierter DegP-bindender Peptide

Die Bestimmung der Bindekonstanten der neu identifizierten PDZ-bindenden Peptide an DegP_{S210A} wurde mittels ITC bei 37°C durchgeführt. Dazu wurden Ligand und Proteine in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8 gelöst. Während DegP_{S210A} 20 μM eingesetzt wurde, variierte die Konzentration der Peptide je nach deren Löslichkeit und Stärke der Bindung. Die Daten wurden nach dem Modell „one set of sites“ gefittet. Die ermittelten Bindekonstanten (K_d) und die in den pNA-Enzymtests ermittelten Aktivierungswerte sind in der Tabelle dargestellt; ^a 1 entspricht einer spezifischen Aktivität von 15 nmol x mg⁻¹ x min⁻¹.

Ligand	Aminosäuresequenz	x-fache Aktivierung [Normiert] ^a	K_d [μM]
β -Casein	-	10,0	3,75
YCDB	DYFGSALLRV	14,5	4,61
YECR	CHHSAFPVFL	10,2	8,31
BTUB	EYTLSGSYTF	2,0	8,47
-YFF	DNRDGNVYFF	4,5	16,37
BGLX	RVKKGEFELL	2,0	75,76

Mit den in dieser Arbeit identifizierten an DegP bindenden Peptiden YCDB (DYFGSALLRV) und YECR (CHHSAFPVFL) konnten neue starke Aktivatoren von DegP identifiziert werden. Eine Korrelation zwischen der DegP-Aktivierung und der Bindungsaffinität zu DegP wurde nicht bei allen Aktivatoren festgestellt.

4.1.5.4 Der Einfluss der neu identifizierten Aktivatoren auf den oligomeren Zustand von DegP

Um den Einfluss der neu identifizierten Aktivatoren YCDB und YECR auf den oligomeren Zustand von DegP zu untersuchen, wurden Cross-Link Untersuchungen (vergleiche 4.1.4.1) durchgeführt³. Während die proteolytisch inaktive Mutante DegP_{S210A} in einer Konzentration von 0,6 μM eingesetzt wurde, wurden verschiedene Konzentrationen der Aktivatoren getestet (Daten nicht gezeigt). Wie bereits in 4.1.4.1 gezeigt, liegt DegP_{S210A} in Abwesenheit von Aktivatoren hauptsächlich als Hexamer, Trimer und Monomer vor. Die Zugabe bereits niedriger Konzentrationen (10 μM) des Aktivators YECR führte zum vermehrten Auftreten des 12mers und 24mers und zu einer Abnahme der hexameren, trimeren und monomeren

³ Die Cross-Link Untersuchungen wurden von Lina Spaan durchgeführt.

Moleküle. Bei einer Konzentration von 250 μM war bereits eine vollständige Umlagerung zu höheren Oligomeren zu beobachten. Dahingegen induzierte das Aktivatorpeptid YCDB einen nur marginalen Switch vom Hexamer zum 12mer und 24mer bei einer eingesetzten Konzentration von mindestens 100 μM . Die Ergebnisse untermauern die Erkenntnis, dass die DegP-Aktivierung einhergeht mit einer Verschiebung des oligomeren Zustandes vom Hexamer zum 12mer und 24mer. Allerdings konnte hier keine absolute Korrelation zwischen Stärke der Aktivierung und Ausbildung höherer Oligomere belegt werden.

Der Aktivator YECR mit der Sequenz CHHSAFPVFL stellt somit einen neuen starken Aktivator von DegP dar, der mit hoher Affinität an DegP bindet, es 10,2-fach aktiviert und schon in niedrigen Konzentrationen zu der Umlagerung vom Hexamer zu 12mer und 24mer führt.

4.2 Charakterisierung der PDZ-Domänen von DegP

Ein besonderes Augenmerk sollte in dieser Arbeit auf die Rolle der beiden PDZ-Domänen für den Mechanismus der allosterischen DegP-Aktivierung gerichtet werden. Während der PDZ1-Domäne von DegP eine wesentliche Rolle in der Substratbindung und Aktivierung von DegP zugesprochen wird, wird postuliert, dass die PDZ2-Domäne wichtig ist für die Oligomerisierung von DegP (Spiess *et al.*, 1999; Sassoon *et al.*, 1999; Clausen *et al.*, 2002; Iwanczyk *et al.*, 2007; Krojer *et al.*, 2008b).

Für die HtrA-Protease DegS konnte bereits die entscheidende Rolle der PDZ-Domäne für den Aktivierungsmechanismus herausgearbeitet werden. Unter stressfreien Bedingungen inhibiert diese DegS in seiner Proteasefunktion, in dem sie Strukturen der Proteasedomäne im inaktiven Zustand fixiert. Bei Faltungsstress binden allosterische Aktivatoren an die PDZ-Domäne, was zu einer Umorientierung der PDZ-Domäne führt (Walsh *et al.*, 2003; Wilken *et al.*, 2004; Sohn *et al.*, 2007; Hasselblatt *et al.*, 2007). Initiiert durch diesen Prozess finden Umstrukturierungen in der Proteasedomäne statt, die letztendlich dazu führen, dass DegS in seiner aktiven Form vorliegt.

4.2.1 Analyse der PDZ-Domänen von DegP

Um die Rolle der PDZ-Domänen für die Regulation von DegP genauer zu untersuchen, sollten die PDZ-Domänen in einem ersten Schritt einzeln gereinigt werden. Dazu wurden die Plasmide pNK11, pNK12 und pNK13 konstruiert, die für die DegP-PDZ-Domänen einzeln und in Kombination kodieren. Außerdem wurde das Plasmid pNK14 konstruiert, das für die DegS-PDZ-Domäne kodiert. Alle Domänen wurden am C-Terminus mit einem His-Tag

fusioniert. Nach einer Ni-Affinitätsreinigung sollten die Proteine anschließend in Bindungsstudien mit DegP-Aktivatoren charakterisiert werden. In einem weiteren Schritt sollte ermittelt werden, ob die einzeln gereinigten PDZ-Domänen PDZ-Deletionsmutanten in ihrer Proteaseaktivität komplementieren.

4.2.1.1 Reinigung der PDZ-Domänen von DegP und von DegS

Ausgehend von den Plasmiden pNK11, pNK12, pNK13 und pNK14 wurden die zu untersuchenden PDZ-Domänen (PDZ1 (DegP), PDZ2 (DegP), PDZ1+2 (DegP), PDZ (DegS)) aus dem Stamm *E. coli* BL21 (DE3) gereinigt. Dazu wurden vorerst Induktions- und Expressionstests bei verschiedenen Temperaturen und IPTG-Konzentrationen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die beste Ausbeute konnte bei einer Induktion mit 100 μ M IPTG und einer Expression über Nacht bei 20°C erreicht werden (siehe Abb. 4-7A). Unter diesen Bedingungen wurden die Domänen anschließend gereinigt und die Proteinproben auf dem Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassieblau-Färbung analysiert (siehe Abb. 4-7B). Es wurde Hauptbanden detektiert, die bei 10,5 kDa (PDZ1 (DegP)), 11,5 kDa (PDZ2 (DegP)), 20 kDa (PDZ1+2 (DegP)) und 11 kDa (PDZ (DegS)) lagen. Dabei entsprach die Laufhöhe der Proteinbande der PDZ2-Domäne nicht der erwarteten Größe von 9,5 kDa. Die Westernblot-Analyse und die Plasmidsequenzierung bestätigen allerdings die Korrektheit des Konstrukts und des Proteins, so dass ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel die Begründung sein kann. Der Reinheitsgrad der gereinigten Domänen betrug >95% und die Ausbeute lag zwischen 2 und 10 mg pro Liter Kultur.

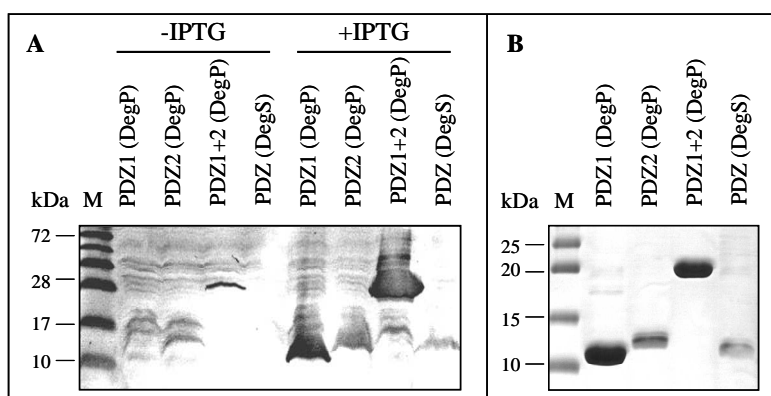


Abb. 4-7: Expression und Reinigung der PDZ-Domänen von DegP und DegS

Gezeigt ist der Induktionstest zu der Expression der PDZ-Domänen von DegP und DegS, der bei 20°C und einer IPTG-Konzentration von 100 μ M durchgeführt wurde. Nach einer Inkubation über Nacht wurden Proben entnommen und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Der Nachweis erfolgte über einen Western-Blot mit dem Penta His Antikörper als Erstantikörper (A). Die Reinigung der PDZ-Domänen erfolgte unter nativen Konditionen über Ni-TED-Säulen. Der Nachweis nach dem Aufkonzentrieren erfolgte mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (B). M: Proteinmarker.

4.2.1.2 Validierung der Bindung von Liganden an die PDZ-Domänen von DegP und DegS mittels ITC

Um zu untersuchen, ob allosterische DegP-Aktivatoren, wie in zahlreichen Studien vermutet, an die PDZ1-Domäne von DegP binden, wurden ITC-Messungen mit den beiden PDZ-Domänen von DegP und den allosterischen DegP Aktivatoren β -Casein und DNRDGNVYFF durchgeführt. Für die PDZ1-Domäne von DegP und das Peptid DNRDGNVYFF ergab die Messung eine K_d von 31,45 μ M (siehe Tab. 4-6). Dahingegen konnte keine signifikante Bindung zu β -Casein detektiert werden. Die PDZ2-Domäne zeigte zu keinem der beiden Aktivatoren eine signifikante Bindung. Des Weiteren wurden ITC-Messungen mit den beiden PDZ-Domänen in Kombination (PDZ1+2 (DegP)) und den beiden Aktivatoren durchgeführt. Auch in diesen Messungen konnte keine signifikante Bindung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass die PDZ1-Domäne alleine das Peptid DNRDGNVYFF bindet, die beiden PDZ-Domänen in Kombination allerdings nicht, lässt die Vermutung aufkommen, dass die Bindestellen für Liganden der PDZ-Domänen eventuell nicht frei zugänglich sind. Auch die eher schlechte K_d von 31,45 μ M zwischen PDZ1 (DegP) und DNRDGNVYFF im Vergleich zu der K_d von 16,37 μ M zwischen DegP_{S210A} und dem Peptid kann ein Hinweis darauf sein. Das Peptid DNRDGNVYFF, das als Aktivator von DegS bekannt ist, zeigte mit einer K_d von 4,12 μ M eine starke Bindung an die PDZ-Domäne von DegS.

Tab. 4-6: Bindungsaffinitäten zwischen β -Casein sowie DNRDGNVYFF und den PDZ-Domänen von DegP und von DegS

Die Bestimmung der Bindekonstanten zwischen β -Casein bzw. DNRDGNVYFF und den PDZ-Domänen von DegP und DegS wurde mittels ITC bei 37°C durchgeführt. Dazu wurden Ligand und PDZ-Domäne in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8 gelöst. Während die PDZ-Domänen 20 μ M eingesetzt wurden, variierte die Konzentration des Liganden je nach Stärke der Bindung. Die Daten wurden nach dem Modell „one set of sites“ gefittet. Die ermittelten Bindekonstanten (K_d) sind in der Tabelle dargestellt. -: keine signifikante Bindung.

Mutante	Ligand	K_d [μ M]
PDZ1 (DegP)	β -Casein	-
PDZ2 (DegP)	β -Casein	-
PDZ1 (DegP)	DNRDGNVYFF	31,45
PDZ2 (DegP)	DNRDGNVYFF	-
PDZ (DegS)	DNRDGNVYFF	4,12
DegP _{S210A}	β -Casein	3,75
DegP _{S210A}	DNRDGNVYFF	16,37

Die Tatsache, dass β -Casein nicht an die PDZ-Domänen von DegP bindet, deutet darauf hin, dass eine Bindung an die Proteasedomäne stattfindet. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollten daher Bindungsstudien mit den DegP-Deletionsmutanten DegP _{Δ PDZ2} und DegP _{Δ PDZ1+2}

durchgeführt werden, um in diesem Zusammenhang eindeutiger Aufschluss zu geben (siehe 4.2.2.6).

4.2.1.3 Oligomerisierung der PDZ-Domänen von DegP und DegS

Die Daten aus 4.2.1.2 lassen vermuten, dass die Bindestellen der einzeln und in Kombination gereinigten PDZ-Domänen eventuell nicht frei zugänglich sind. Eine Ursache dafür kann die Ausbildung von Multimeren sein, die zu einer Orientierung der PDZ-Domänen zueinander führt, die die Bindestelle für allosterische Aktivatoren blockiert. Um dies aufzuklären, wurden Oligomerisierungsanalysen der gereinigten PDZ-Domänen mittels Gelfiltrationsexperimenten durchgeführt. Dazu wurden je 2 mg der gereinigten Domänen auf einer Superdex 75 analysiert. Während die Domänen PDZ1 (DegP), PDZ1+2 (DegP) und PDZ (DegS) als Dimer vorlagen, handelte es sich bei der PDZ2 (DegP) um ein Monomer. Abb. 4-8 zeigt beispielhaft die Gelfiltrationsanalyse der PDZ1+2 von DegP.

Das Ausbilden von Dimeren könnte je nach Orientierung der Domänen zueinander zu einer Blockierung der Substratbindetaschen der PDZ-Domänen führen. Dies könnte eine Erklärung für die in 4.2.1.2 ermittelten Ergebnisse sein.

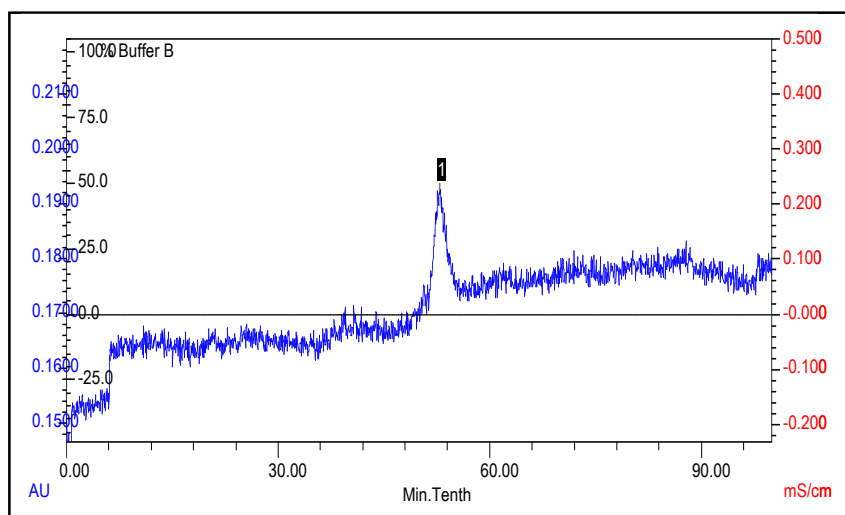


Abb. 4-8: Gelfiltration von DegP-PDZ1+2

Zur Bestimmung des oligomeren Zustandes der PDZ-Domänen wurden je 2 mg der Domänen mittels Gelfiltration auf einer Superdex 75 analysiert. Zuvor wurde eine Kalibrierung der Säule durchgeführt. Aufgrund des Elutionsvolumens und anhand der Kalibrierung konnte das Molekulargewicht der Proben bestimmt und somit deren oligomerer Zustand benannt werden. Die Umrechnung des Elutionspeaks bezüglich der Gelfiltration von DegP-PDZ1+2 ergab ein Molekulargewicht von 41182 Da. Somit liegt DegP-PDZ1+2 als Dimer vor.

4.2.1.4 Komplementieren einzelne PDZ-Domänen DegP-Deletionsmutanten in ihrer proteolytischen Aktivität?

Untersuchungen zu DegS haben gezeigt, dass die exakte Orientierung der PDZ-Domäne in diesem Protein essentiell ist für den Mechanismus der allosterischen Aktivierung durch Stresspeptide (Walsh *et al.*, 2003; Wilken *et al.*, 2004; Sohn *et al.*, 2007, Hasselblatt *et al.*, 2007).

Um zu ermitteln, ob die exakte Orientierung der PDZ-Domänen und die Fixierung dieser Domänen an DegP ebenfalls für den Aktivierungsmechanismus essentiell ist, sollte die Frage beantwortet werden, ob einzelne PDZ-Domänen sich so an DegP-Deletionsmutanten anlagern, dass sie zu einer gesteigerten Proteaseaktivität beitragen. Dazu wurden die PDZ-Deletionsmutanten DegP Δ PDZ2 und DegP Δ PDZ1+2 ausgehend von den Plasmiden pNK22 und pRS1 aus dem Stamm MA001 gereinigt (siehe Abb. 4-11). Anschließend wurde die Proteaseaktivität dieser Deletionsmutanten in Enzymtests mit den Substraten SPMFKGV-pNA und β -Casein untersucht. Im pNA-Enzymtest wurde die spezifische Aktivität der Deletionsmutanten ermittelt und in Relation gesetzt zu der Aktivität des Wildtyp-DegP. Während die spezifische Aktivität von DegP Δ PDZ2 bei 35% lag, zeigte DegP Δ PDZ1+2 eine im Vergleich zum Wildtyp 5%ige Aktivität. Auch im β -Casein Enzymtest zeigten die beiden Deletionsmutanten eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Aktivität. Zur Durchführung dieses Enzymtests wurde das zu untersuchende Protein mit β -Casein inkubiert und alle drei Minuten eine Probe entnommen, die auf dem Polyacrylamidgel analysiert wurde. Während das Wildtyp-DegP das β -Casein in 18 min nahezu abbaut (siehe Abb. 4-9), konnte kein β -Caseinabbau durch DegP Δ PDZ1+2 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). DegP Δ PDZ2 baute das Substrat nach etwa 45 min vollständig ab (siehe Abb. 4-9). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die PDZ2-Domäne keine essentielle Rolle für die Hydrolyse von β -Casein einnimmt.

Um zu untersuchen, ob die einzeln gereinigten PDZ-Domänen die Deletionsmutanten in ihrer Proteaseaktivität komplementieren, wurde DegP Δ PDZ1+2 mit der Doppeldomäne PDZ1+2 und DegP Δ PDZ2 mit der Domäne PDZ2 vorinkubiert und die Proteingemische anschließend in die Enzymtests eingesetzt. Als Kontrolle dienten Enzymtests, die nur mit der PDZ2 bzw. PDZ1+2-Domäne angesetzt wurden. Sowohl im β -Casein Enzymtest als auch im pNA-Enzymtest ergab sich durch die Zugabe der einzelnen Domänen zu den Deletionsmutanten keine Steigerung der proteolytischen Aktivität. In den Kontrollexperimenten war ebenfalls keine Proteaseaktivität zu verzeichnen. Abb. 4-9 zeigt beispielhaft die Ergebnisse des β -Casein Enzymtests mit DegP Δ PDZ2 und PDZ2.

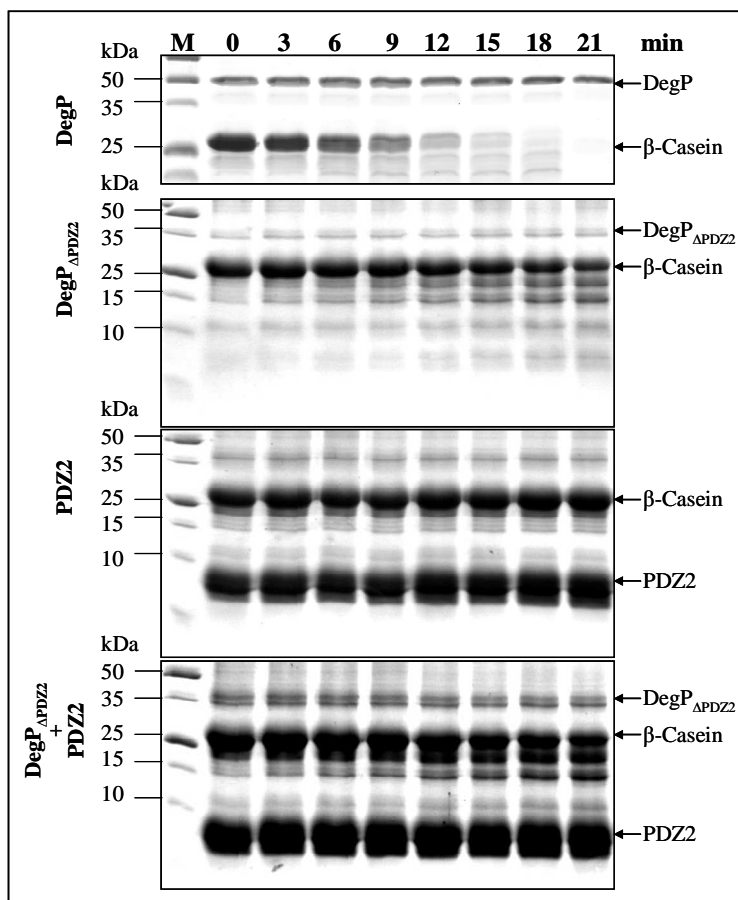


Abb. 4-9: Komplementation der proteolytischen Aktivität im Abbau von β -Casein von $\text{DegP}_{\Delta\text{PDZ2}}$ durch PDZ2

Dargestellt ist der Abbau von β -Casein über die Zeit, unter dem Aspekt, ob die einzelne PDZ2-Domäne die DegP PDZ2-Deletionsmutante in ihrer proteolytischen Aktivität komplementiert. Dazu wurde sowohl die Deletionsmutante als auch die PDZ2-Domäne einzeln und beide Kombination getestet. In Kombination wurden $\text{DegP}_{\Delta\text{PDZ2}}$ und PDZ2 1:1; 1:6; 1:10 und 1:25 eingesetzt. Dargestellt ist hier das Verhältnis 1:25. Die Proteine (1 μM $\text{DegP}_{\Delta\text{PDZ2}}$ und 25 μM PDZ2) wurden dazu für 10 min in 100 mM NaH_2PO_4 , pH 8 vorinkubiert und anschließend das β -Casein (20 μM) dazu gegeben. Alle 3 min wurden 20 μl entnommen und eine Acetonfällung durchgeführt. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Proteinnachweis mittels einer Coomassie-Blau Färbung. Zum Vergleich ist der β -Caseinabbau durch das Wildtyp- DegP dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die einzelnen PDZ-Domänen in Lösung nicht so an die Proteasedomäne anlagern, dass sie die Proteaseaktivität der Deletionsmutanten wesentlich erhöhen. Eine exakte Orientierung relativ zur Proteasedomäne von DegP ist mit hoher Wahrscheinlichkeit für die proteolytische Aktivität notwendig.

4.2.2 Mutationsanalyse der PDZ-Domänen von DegP

Vorangegangene Studien deuten darauf hin, dass die PDZ-Domänen von DegP eine wichtige Rolle in der proteolytischen Aktivität, der Aktivierung und der Oligomersierung spielen (Krojer *et al.*, 2002; Murwantoko *et al.*, 2004 Krojer *et al.*, 2008a; Krojer *et al.*, 2008b, Jiang *et al.*, 2008). Um die Rolle der PDZ-Domänen für die Regulation von DegP genauer zu

untersuchen, wurden PDZ1-Punktmutanten und Deletionsmutanten konstruiert, gereinigt und charakterisiert. Der primäre Fokus wurde dabei auf die PDZ1-Domäne gerichtet, da es bereits Hinweise darauf gibt, dass diese Domäne entscheidend für die Substratbindung und Aktivierung von DegP ist (Spiess *et al.*, 1999; Sassoon *et al.*, 1999; Clausen *et al.*, 2002; Iwanczyk *et al.*, 2007; Krojer *et al.*, 2008b). Zur Auswahl der Punktmutationen wurde die Röntgenkristallstruktur des hexameren DegP zur Hilfe genommen (Krojer *et al.*, 2002). Abb. 4-10 zeigt die Peptidbindetasche der PDZ1-Domäne, in die ein Ligand des gut untersuchten PDZ-Proteins PSD95 modelliert wurde. Sie besteht aus dem β -Strang 14, seinem N-terminalen Loop und der Helix H. Der Carboxylatbindeloop der PDZ1 wird durch das Motiv ELGI gebildet. Eine wichtige Aminosäure ist R262, das sich in Richtung der Carboxylatgruppe des Substrats orientiert und die Proteasedomäne mit der PDZ-Domäne verbindet. Wie in Abb. 4-10 zu erkennen, wird die PDZ1-Bindetaschen hauptsächlich durch hydrophobe Aminosäuren gebildet. Ausgehend von dieser Struktur wurden die sechs Aminosäuren R262, L265, I267, M268, L324 und V328 gewählt, die gegen hydrophile Aminosäuren ausgetauscht werden sollten. Bei den so entstandenen Punktmutanten handelte es sich um DegP_{R262A}, DegP_{L265N}, DegP_{I267N}, DegP_{M268Q}, DegP_{L324N} und DegP_{V328S}. Des Weiteren wurden die Doppelmutante DegP_{R262A,V328S} und die Deletionmutanten DegP Δ PDZ2 und DegP Δ PDZ1+2 konstruiert, gereinigt und in weiteren Analysen untersucht. Für die geplanten Oligomerisierungsanalysen und Bindungsstudien wurden ebenfalls die proteolytisch inaktiven Varianten (S210A) der PDZ-Mutanten kloniert und gereinigt.

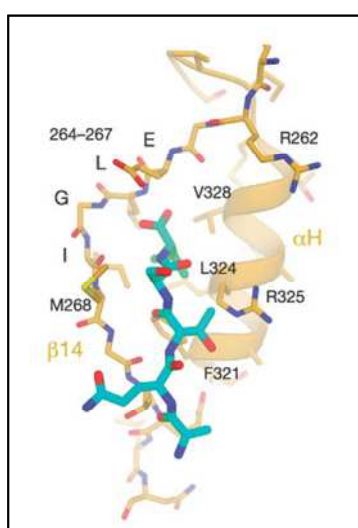


Abb. 4-10: Peptidbindetasche der PDZ1-Domäne von DegP (Krojer *et al.*, 2002)

Dargestellt ist die Peptidbindetasche der PDZ1 von DegP, die aus dem β -Strang 14, seinem N-terminalen Loop und der Helix H gebildet wird. Der Carboxylatbindeloop wird durch das Motiv ELGI gebildet. Nach Überlagerung der Proteine DegP und PSD95 wurde ein Peptidligand von PSD95 in die PDZ1 modelliert (dargestellt in blau).

4.2.2.1 Reinigung der PDZ-Mutanten von DegP

Die Mutanten DegP_{R262A}, DegP_{L265N}, DegP_{I267N}, DegP_{M268Q}, DegP_{L324N}, DegP_{V328S}, DegP_{ΔPDZ2} und DegP_{ΔPDZ1+2} sowie die proteolytisch inaktiven Varianten dieser Mutanten (SA-Mutante) wurden aus dem Stamm MA001 gereinigt (siehe Abb. 4-11). Die Ausbeuten lagen zwischen 5 und 15 mg pro Liter Flüssigkultur und die Reinheit bei >95%. Die proteolytisch aktiven Mutanten zeigten eine maximale Autoproteolyse von 5%. Da bereits bekannt war, dass die proteolytische Aktivität der Deletionsmutante DegP_{ΔPDZ1+2} bei maximal 5% der Wildtypaktivität liegt (siehe 4.2.1.4), wurde hier auf die Reinigung der proteolytisch inaktiven SA-Mutante verzichtet.

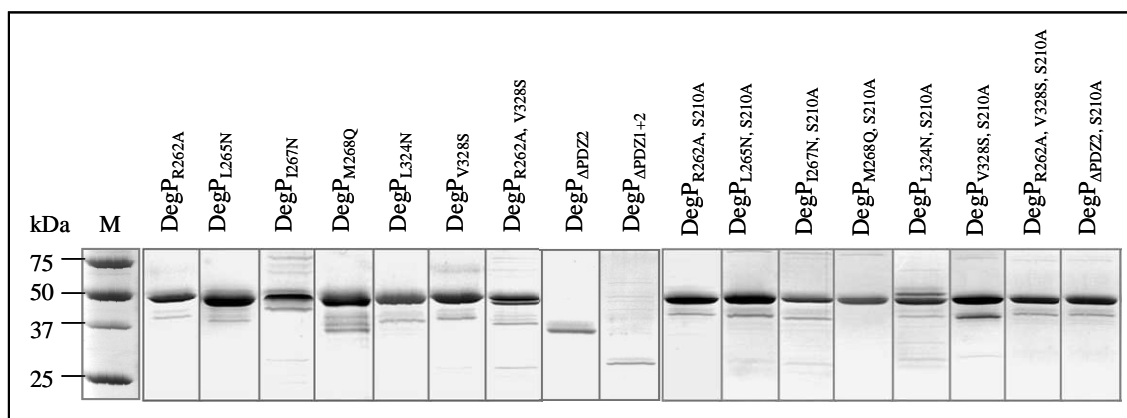


Abb. 4-11: Reinigung der PDZ-Mutanten von DegP

Die Expression der PDZ-Mutanten von DegP erfolgte über Nacht bei 20°C und wurde mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Reinigungen wurden analog zu der Reinigung von DegP und DegP_{S210A} (4.1.1) unter nativen Bedingungen über Ni-TED-Säulen durchgeführt. Der Nachweis erfolgte über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blau Färbung; M: Proteinmarker.

4.2.2.2 *In vivo* Komplementation eines *degP*⁻ - Stammes durch DegP PDZ-Mutanten

Die Funktion von DegP kann *in vivo* über die Komplementation eines *degP*⁻ -Stammes untersucht werden. *degP*⁻ -Stämme besitzen einen temperatursensitiven Phänotyp, wobei DegP bei Temperaturen über 42°C essentiell ist. Die beschriebene Temperatursensitivität kann durch Plasmid kodiertes *degP* (auf dem Plasmid pCS20) komplementiert werden. Die Expression des Gens *degP*_{S210A} (auf dem Plasmid pCS21), das für die proteolytisch inaktive Mutante von DegP kodiert, führt zu einer sehr schwachen Komplementation des Phänotyps (Spiess, 1999), die durch die verbleibende Chaperonaktivität von DegP_{S210A} erklärt werden kann. Die *in vivo* Komplementation gibt somit vorrangig Aufschluss über die Proteaseaktivität von DegP. Eingeschränkt kann dieses Experiment ebenfalls Hinweise auf die Chaperonaktivität von DegP geben. Zur Durchführung des *in vivo* Komplementationstests wurde der Stamm KU98 (*degP*⁻), der das Plasmid von Interesse enthielt, über Nacht

angezogen und am nächsten Morgen auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt. Ausgehend von dieser Kultur wurden Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-7} angefertigt und je 2 μ l dieser Proben auf NZA-Agarplatten mit 1 μ M IPTG aufgetropft. Es folgte eine Inkubation für 16 h bei 43°C und das Wachstum wurde semiquantitativ bewertet (siehe Abb. 4-12).

Als Positivkontrolle wurde der *E. coli*-Stamm DHB4 angezogen, der unter den genannten Bedingungen ein sehr gutes Wachstum aufwies (siehe Tab. 4-7). Wie einleitend beschrieben, zeigte der Stamm KU98 (pCS20) ein im Vergleich zur Positivkontrolle nur leicht verringertes Wachstum, wohingegen das Protein DegP_{S210A}, kodiert durch das Plasmid pCS21, die Temperatursensitivität nur sehr schwach komplementierte (siehe Tab. 4-7). Als Negativkontrolle diente der Stamm KU98 (pCS19), der unter den genannten Bedingungen nicht wuchs.

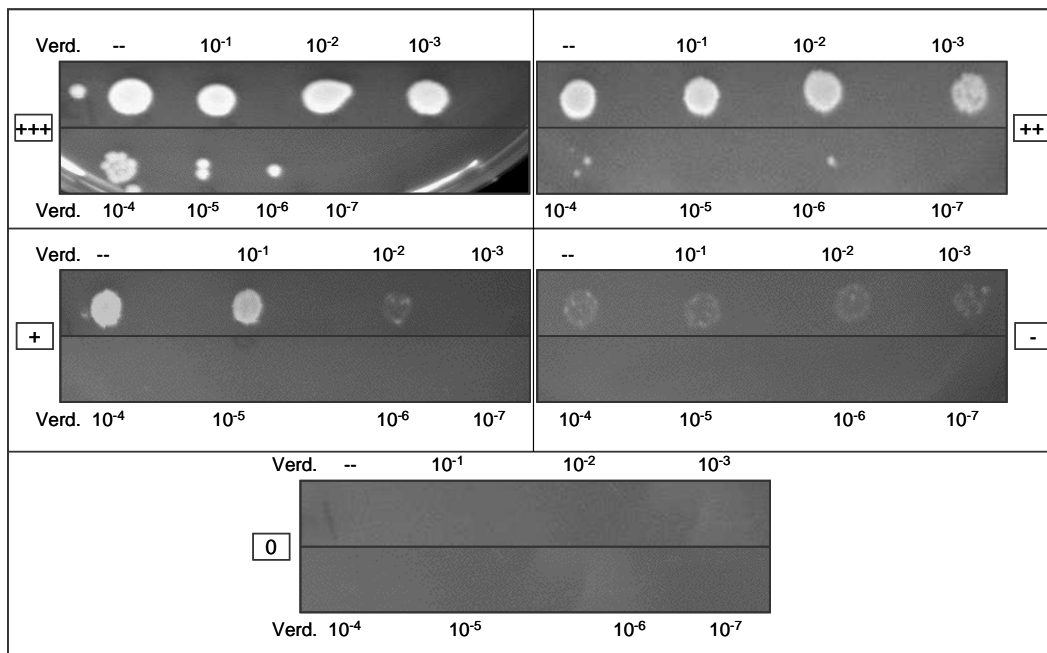


Abb. 4-12: *In vivo* Komplementation der Hitzesensibilität

Zum Testen der *in vivo* Komplementation der Hitzesensibilität eines *degP*⁻ - Stammes wurden, ausgehend von einer Kultur mit einer OD_{600} von 0,1, verschiedene Verdünnungen (10^{-1} - 10^{-7}) des zu untersuchenden Stammes angefertigt. Davon wurden je 2 μ l auf Agarplatten mit 1 μ M IPTG getropft und 16 h bei 43°C inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum bewertet.

+++ : sehr gutes Wachstum / vollständige Komplementation; ++ : gutes Wachstum / leicht verringerte Komplementation;

+ : mäßiges Wachstum / moderate Komplementation; - : geringes Wachstum / schlechte Komplementation;

0 : kein Wachstum / keine Komplementation.

Während die Mutanten DegP_{M268Q} und DegP_{V328S} eine dem Wildtyp vergleichbare Komplementation der Temperatursensitivität zeigten, führte die Expression der Mutanten DegP_{L267N}, DegP_{L324N}, und DegP _{Δ PDZ1+2} nicht zum Wachstum der Zellen. Die Proteine DegP_{R262A}, DegP_{L265N}, DegP_{R262A} und DegP_{V328S} komplementierten die Temperatursensitivität nur schwach. Dabei war das Wachstum der entsprechenden Stämme vergleichbar zu dem

Wachstum des Stamms KU98 (pCS21). Die Deletionsmutante DegP_{ΔPDZ2} zeigte ein mäßiges Wachstum bei den genannten Bedingungen.

Die Daten zeigen zusammengefasst, dass bestimmte Punktmutationen in der PDZ1-Domäne zu einem vollständigen Funktionsverlust in der *in vivo* Komplementation eines *degP*-Stammes führen können. Die Deletion der PDZ2-Domäne führt hingegen nicht zum vollständigen Funktionsverlust von DegP.

Tab. 4-7: Komplementation der Hitzesensibilität durch DegP PDZ-Mutanten

Zum Testen der *in vivo* Komplementation der Hitzesensibilität wurde der Stamm KU98 (*degP*) mit den entsprechenden Plasmiden auf Agarplatten mit 1μM IPTG getropft (2 μl verschiedener Verdünnungen) und 16 h bei 43°C inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum bewertet.

+++ : sehr gutes Wachstum / vollständige Komplementation; ++ : gutes Wachstum / leicht verringerte Komplementation;

+: mäßiges Wachstum / moderate Komplementation; -: geringes Wachstum / schlechte Komplementation;

0: kein Wachstum / keine Komplementation

Stamm	Protein	Komplementation
DHB4	-	+++
KU98 (pCS19)	-	0
KU98 (pCS20)	DegP	++
KU98 (pCS21)	DegP _{S210A}	-
KU98 (pXC2)	DegP _{R262A}	-
KU98 (pSG41)	DegP _{L265N}	-
KU98 (pXC3)	DegP _{I267N}	0
KU98 (pNM1)	DegP _{M268Q}	++
KU98 (pSG42)	DegP _{L324N}	0
KU98 (pSG40)	DegP _{V328S}	++
KU98 (pNK23)	DegP _{R262A, V328S}	-
KU98 (pNK22)	DegP _{ΔPDZ2}	+
KU98 (pRS1)	DegP _{ΔPDZ1+2}	0

4.2.2.3 Die proteolytische Aktivität von DegP PDZ-Mutanten

Um die PDZ-Mutanten im Hinblick auf ihre proteolytische Aktivität zu untersuchen, wurden sie in pNA-Enzymtests und Enzymtests mit β-Casein untersucht. Zusätzlich wurde der Caseinabbau auf Zymogramm-Gelen betrachtet.

4.2.2.3.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität von DegP PDZ-Mutanten im pNA-Enzymtest

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der PDZ-Mutanten wurden diese in pNA-Enzymtests untersucht. Unter nicht aktivierenden Bedingungen wurden die Substrate SPMFKGV-pNA und DPMFKLV-pNA eingesetzt und die Aktivitäten mit der wildtypischen Aktivität verglichen. Abb. 4-13 zeigt die Ergebnisse des Enzymtests mit dem Substrat

SPMFKGV-pNA. Während die Mutanten DegP_{M268Q} und DegP_{V328S} eine dem Wildtyp vergleichbare Aktivität (88% und 110%) zeigten, waren die Mutanten DegP_{L265N}, DegP_{L267N} und DegP_{R262A,V328S} proteolytisch inaktiv. Eine eingeschränkte Proteaseaktivität zeigte mit 50% der wildtypischen Aktivität die Mutante DegP_{R262A}. Während die Aktivität der Proteine DegP_{L324N} und DegP_{ΔPDZ1+2} unter 10% lag, wies die Deletionsmutante DegP_{ΔPDZ2} eine Restaktivität von 35% auf.

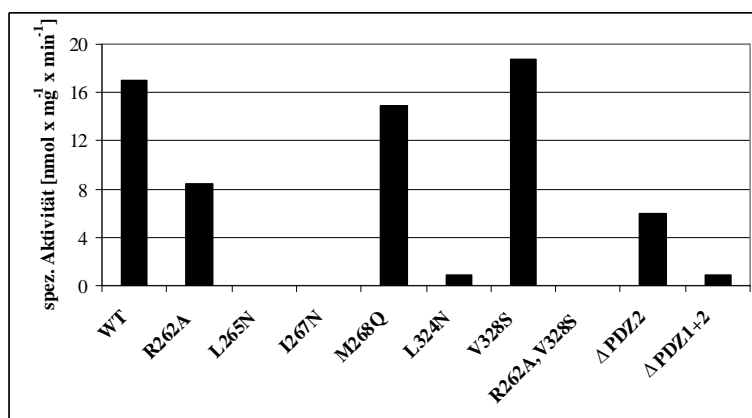


Abb. 4-13: Bestimmung der spezifischen Aktivität der DegP PDZ-Mutanten mit dem Substrat SPMFKGV-pNA

Dargestellt ist die spezifische Aktivität von DegP PDZ-Mutanten, die im Enzymtest mit dem Substrat SPMFKGV-pNA ermittelt wurde. Dazu wurden 0,5 mM des Substrats mit 1 μ M DegP in 50 mM NaH₂PO₄, pH 8 für 1 h bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 405 nm über die Zeit gemessen. Aus den ermittelten Werten wurde die spezifische Aktivität ermittelt. Die Standardabweichung lag unter 20%.

Im Vergleich zu den Ergebnissen des Enzymtests mit dem Substrat SPMFKGV-pNA zeigten die getesteten Mutanten im Test mit dem Substrat DPMFKLV-pNA relativ zum Wildtyp wesentlich geringere Aktivitäten (siehe Abb. 4-14). Dabei war das Protein DegP_{V328S} mit einer Restaktivität von 25% das proteolytisch aktivste. Die Aktivitäten der anderen Mutanten lagen unter 10%.

Interessanterweise führten die Mutationen in der PDZ1-Domäne im Aktivitätstest mit dem optimierten Substrat DPMFKLV-pNA zu einer Restaktivität von etwa 20 nmol x mg⁻¹ x min⁻¹, was der wildtypischen Aktivität im Enzymtest mit dem Substrat SPMFKGV-pNA entspricht.

Dies deutet darauf hin, dass das Substrat SPMFKGV-pNA nicht spezifisch an DegP und somit an die PDZ1-Domäne bindet. Gelangt es in die Nähe des aktiven Zentrums, wird es ohne die spezifische Bindung hydrolysiert. Dahingegen scheint das Substrat DPMFKLV-pNA spezifisch an DegP und somit an seine PDZ1-Domäne zu binden, so dass Mutationen in der Bindetasche zu einer Restaktivität führen, die der unspezifischen Bindung entspricht.

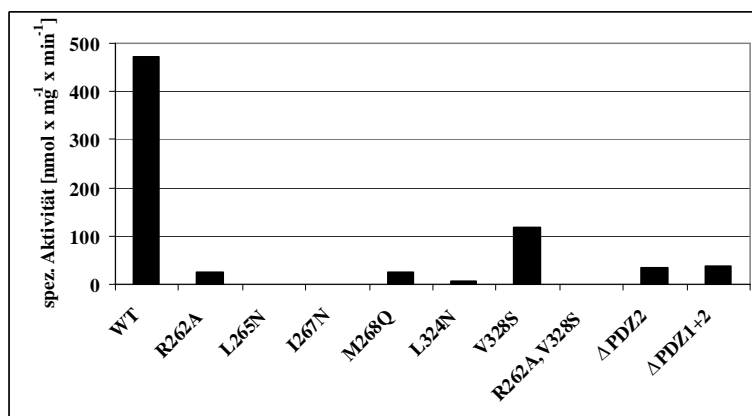


Abb. 4-14: Bestimmung der spezifischen Aktivität der PDZ-Mutanten von DegP mit dem Substrat DPMFKLV-pNA

Dargestellt ist die spezifische Aktivität von DegP PDZ-Mutanten, die im Enzymtest mit dem Substrat DPMFKLV-pNA ermittelt wurde. Dazu wurden 0,5 mM des Substrats mit 0,1 μ M DegP in 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8 für 1 h bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 405 nm über die Zeit gemessen. Aus den ermittelten Werten wurde die spezifische Aktivität ermittelt. Die Standardabweichung lag unter 20%.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse die überaus wichtige Rolle der PDZ1-Domäne und bestimmter einzelner Aminosäuren dieser Domäne für die proteolytische Aktivität von DegP. Auch der Verlust der PDZ2-Domäne führt zu einer Verminderung der Proteaseaktivität.

4.2.2.3.2 Die Hydrolyse von Casein im Zymogramm durch DegP PDZ-Mutanten

Um zu ermitteln, ob die PDZ-Mutanten das Protein Casein proteolytisch spalten, wurden diese im Zymogramm analysiert. Dazu wurden die Proteinproben auf ein nicht denaturierendes Zymogramm-Gel, das Casein enthielt, aufgetragen und dieses nach der Entwicklung bei 37°C in Coomassieblau gefärbt. Der Abbau von Casein zeigte sich als heller Hof um die entsprechende Proteinbande, der semiquantitativ bewertet werden konnte. Während die proteolytisch inaktive Mutante DegP_{S210A} als Negativkontrolle diente, wurde DegP als Positivkontrolle aufgetragen. Der wildtypische Caseinabbau wurde mit dem Symbol +++ bewertet (siehe Abb. 4-15).

Während die Mutanten DegP_{V328S} und DegP_{ΔPDZ2} Casein vergleichbar zum Wildtyp abbauten, waren die Mutanten DegP_{L265N}, DegP_{I267N}, DegP_{L324N}, DegP_{R262A, V328S} und DegP_{ΔPDZ1+2} nicht in der Lage Casein abzubauen. Das Protein DegP_{M268Q} zeigte einen im Vergleich zum Wildtyp leicht reduzierten, DegP_{R262A} einen stark reduzierten Caseinabbau. Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse die wichtige Rolle der PDZ1-Domäne und einzelner Aminosäuren für den proteolytischen Abbau von Casein. Die PDZ2-Domäne scheint in diesem Zusammenhang keine essentielle Bedeutung zu haben.

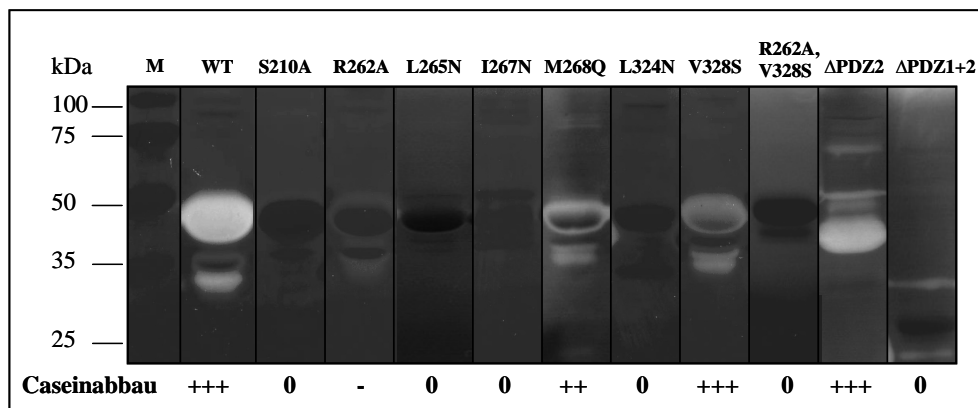


Abb. 4-15: Zymogramm von DegP PDZ-Mutanten

Dargestellt ist ein Zymogramm-Gel nach Anfärbung des Caseins mit Coomassie-Blau. Dazu wurden 10 µg der zu testenden Proteine auf ein nicht denaturierendes, Casein-Zymogramm-Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine renaturiert. Die Entwicklung erfolgte über Nacht bei 37°C. Der Caseinabbau wurde anschließend bewertet. 0: kein Caseinabbau; - sehr geringer Caseinabbau im Vergleich zum Wildtyp; + geringer Caseinabbau im Vergleich zum Wildtyp; ++ leicht reduzierter Caseinabbau im Vergleich zum Wildtyp; +++ wildtypischer Caseinabbau.

4.2.2.3.3 Die Hydrolyse von β -Casein durch DegP PDZ-Mutanten

Als weiteres Modellsubstrat für DegP wurde β -Casein eingesetzt. Dazu wurden die zu untersuchenden Mutanten bei 37°C mit β -Casein inkubiert und anschließend wurden über die Zeit Proben entnommen. Diese wurden auf einem Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert (siehe Abb. 4-16).

Als Positivkontrolle wurde DegP untersucht, das die eingesetzte Menge des β -Caseins innerhalb von 18 min vollständig abbaut (siehe Abb. 4-16). Während die Mutanten DegP_{R262A} und DegP_{M268Q} das β -Casein in einer dem Wildtyp vergleichbaren Zeit abbauten, zeigten die Mutanten DegP_{L265N}, DegP_{I267N}, DegP_{L324N}, DegP_{R262A,V328S} und DegP_{ΔPDZ1+2} keinen β -Caseinabbau. Auch nach mehreren Stunden war keine Hydrolyse zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Während DegP_{ΔPDZ2} das β -Casein etwas langsamer als der Wildtyp abbaut (45 min), konnte bei DegP_{V328S} eine Hyperaktivität festgestellt werden.

Die Daten verdeutlichen die entscheidende Rolle der PDZ1-Domäne und einzelner Aminosäuren dieser Domäne für die proteolytische Aktivität von DegP. Die PDZ2-Domäne spielt nur eingeschränkt eine Rolle, da die Deletion dieser Domäne die Proteolyse lediglich verlangsamt. Die Ergebnisse stimmen in der Tendenz den Erkenntnissen aus den Zymogrammen (siehe 4.2.2.3.2) überein.

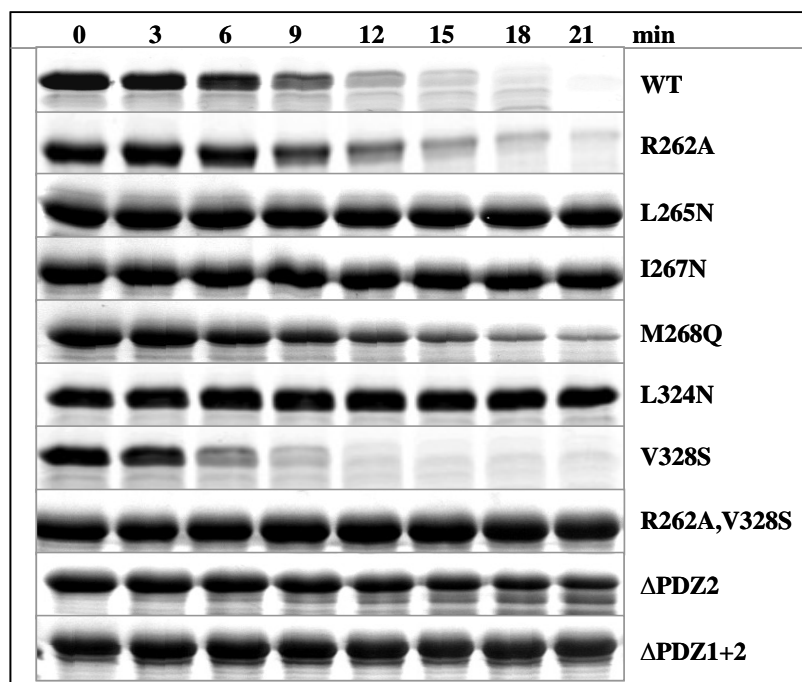


Abb. 4-16: β -Casein Verdau durch DegP PDZ-Mutanten

Dargestellt ist der Abbau von β -Casein durch DegP und DegP PDZ-Mutanten über die Zeit. Dazu wurde 1 μ M DegP mit 20 μ M β -Casein in 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8 bei 37°C inkubiert. Alle drei Minuten wurden 20 μ l entnommen und eine Acetonfällung durchgeführt. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein 15% iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Proteinnachweis mittels einer Coomassie-Blau Färbung.

4.2.2.3.4 Massenspektrometrische Untersuchung der Hydrolyse von Citratsynthase durch DegP PDZ-Mutanten

Neue Studien stellen das Modell der Prozessivität für DegP auf (Krojer *et al.*, 2008b). Es wird postuliert, dass Substrate prozessiv von DegP hydrolysiert werden, indem die PDZ1- und Proteasedomänen eines Trimers miteinander kooperieren. Dabei fixiert die PDZ1-Domäne eines Monomers den C-Terminus des Substrates und präsentiert es der Proteasedomäne, so dass die Hydrolyse erfolgen kann. Aufgrund der ähnlichen Substratspezifität des proteolytischen Zentrums und der PDZ1-Domäne erzeugt der Schnitt ein neues Substrat, das wiederum von einer PDZ1-Domäne fixiert und einer Proteasedomäne präsentiert werden kann. Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Prozesses entstehen Oligopeptide, die eine ähnliche Länge aufweisen.

Um die Rolle einzelner Aminosäuren der PDZ1 in der Prozessivität zu ermitteln, sollten die Proteine β -Casein und Citratsynthase durch DegP und PDZ1-Punktmutanten verdaut werden und die entstandenen Fragmente mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Die C-Termini der entstandenen Fragmente sollten Aufschluss darüber geben, ob Punktmutationen in der PDZ1-Domäne zu einem veränderten Muster der entstehenden Fragmente führen. Das

postulierte Modell der Prozessivität lässt erwarten, dass sich die Fragmentlänge aufgrund einzelner Aminosäureaustausche nicht ändert. Da die Analysen mit β -Casein aufgrund einer hohen Frequenz der Aminosäure Prolin nicht optimal auswertbar waren, wurde ausschließlich die Citratsynthase des Schweins (EC 2.3.3.1) als Substrat verwendet. Aus den drei Punktmutanten mit proteolytischer Aktivität wurden die beiden Mutanten DegP_{R262A} und DegP_{V328S} ausgewählt und die Ergebnisse mit denen von DegP verglichen.

Zur Analyse wurde das entsprechende Protein mit der Citratsynthase inkubiert und die entstandenen Fragmente massenspektrometrisch untersucht⁴. Anschließend wurden die identifizierten Fragmente mit der Sequenz des Ausgangsproteins abgestimmt. Da Fragmente mit der gleichen Aminosäure an der Position P1, aber unterschiedlich langer Sequenz identifiziert wurden, wurden nur die jeweils kürzesten Fragmente in die weitere Auswertung einbezogen. Diese bestand aus der Herstellung eines Profils mit Hilfe des Programms „weblogo“ (www.weblogo.berkeley.edu). Außerdem wurden die Fragmentlängen und die durchschnittliche Fragmentlänge ermittelt.

Abb. 4-17 zeigt das Profil des Citratsynthaseverdaus durch DegP. Während an der Position -1 (P1) eine Präferenz für die hydrophoben Aminosäuren Alanin, Valin und Isoleucin festgestellt werden konnte, zeigten sich keine signifikanten Präferenzen für die nachfolgenden Positionen. An Position -15 wurde eine erhöhte Frequenz der Aminosäuren Phenylalanin (aromatisch), Glutamat (negativ geladen) und Methionin (polar ungeladen) detektiert. Diese Präferenz ist aufgrund der geringen Anzahl der Fragmente mit mehr als 14 Aminosäuren nicht signifikant.

Die Profile der beiden Mutanten DegP_{R262A} und DegP_{V328S} unterscheiden sich nicht wesentlich von dem Profil des Wildtyps (siehe Abb. 4-17). Auch bei diesen beiden Analysen konnte eine Präferenz für die hydrophoben Aminosäuren Valin, Alanin und Isoleucin an der Position -1 (P1) festgestellt werden. Die Präferenz an Position -15 wurde nicht detektiert.

Die Auszählung der Längen der identifizierten Fragmente ergab für DegP einen Mittelwert von 11,6 Aminosäuren (siehe Abb. 4-18). Die Mittelwerte der Punktmutanten lagen mit 11,3 Aminosäuren (DegP_{R262A}) und 10,7 Aminosäuren (DegP_{V328S}) dicht an diesem Wert. Sowohl die Mittelwerte als auch die Verteilungen der Fragmente verschiedener Längen wichen nicht signifikant voneinander ab (siehe Abb. 4-18). Die hier untersuchten Aminosäureaustausche führen somit nicht zu einer Veränderung des Schnittmusters von DegP.

⁴ Die massenspektrometrischen Analysen mittels Nano-LC-MS/MS wurden von Dr. René Zahedi, Department for Proteomics am ISAS Dortmund durchgeführt.

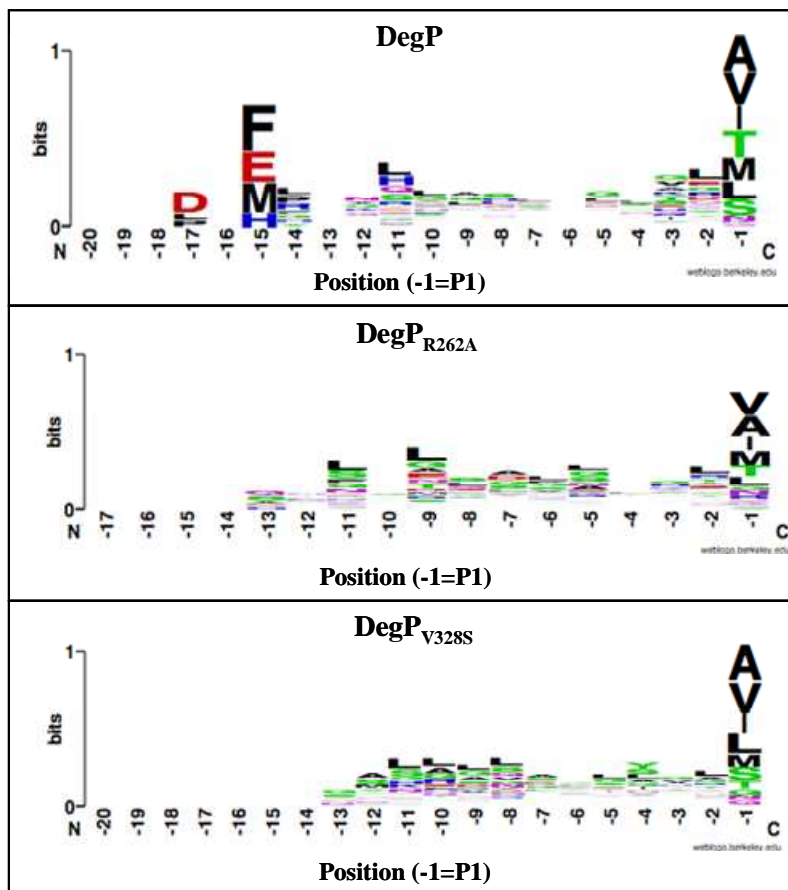


Abb. 4-17: Profil des Komplettverdaus von Citratsynthase durch DegP, DegP_{R262A} und DegP_{V328S}
 Es wurde ein Komplettverdaus von Citratsynthase durch DegP, DegP_{R262A} und DegP_{V328S} durchgeführt und die entstandenen Fragmente mittels Massenspektrometrie identifiziert. Anschließend wurde auf www.weblogo.berkeley.edu ein Profil des Verdaus angefertigt, das hier dargestellt ist. Die Aminosäuresequenz der Fragmente wurde von der N-terminalen Aminosäure P₂₀ bis zur C-terminalen Aminosäure P₁ aufgetragen.

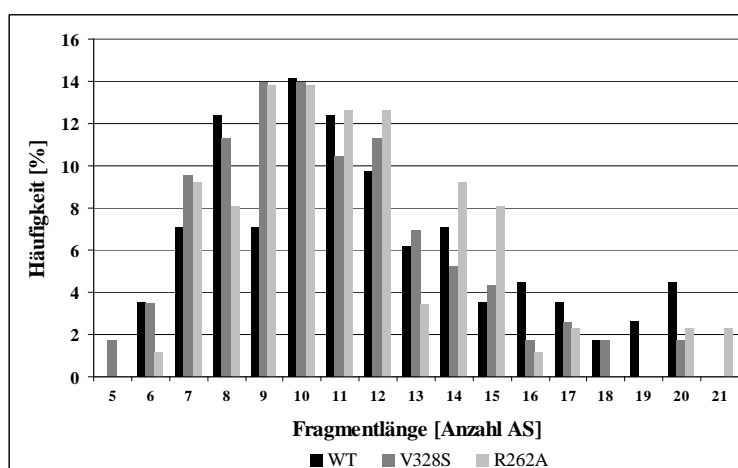


Abb. 4-18: Längen der Fragmente des Komplettverdaus von Citratsynthase durch DegP, DegP_{R262A} und DegP_{V328S}

Es wurde ein Komplettverdaus von Citratsynthase durch DegP, DegP_{R262A} und DegP_{V328S} durchgeführt und die entstandenen Fragmente mittels Massenspektrometrie identifiziert. Die Fragmentlängen wurden ausgezählt und deren Häufigkeit ermittelt. Die Mittelwerte ergaben 11,6 für DegP, 11,3 für DegP_{R262A} und 10,7 für DegP_{V328S}.

4.2.2.4 Aktivierung von DegP PDZ-Mutanten im pNA-Enzymtest

In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass DegP allosterisch aktiviert wird. Die Inkubation mit kleinen Peptiden wie DNRDGNVYFF oder β -Caseinfragmenten ($v\beta$ -Casein), aber auch die Inkubation mit β -Casein führt zu einer erhöhten proteolytischen Aktivität von DegP.

Um die Rolle der PDZ-Domänen und einzelner Aminosäuren der PDZ1-Domäne für die Aktivierung von DegP aufzuklären, wurden die PDZ-Mutanten in pNA-Enzymtests mit verschiedenen Aktivatoren eingesetzt. Ausgehend von den Ergebnissen wurden die spezifischen Aktivitäten ermittelt und diese in Relation gesetzt mit der Aktivität unter nicht aktivierenden Bedingungen. Die so erhaltenen Aktivierungsfaktoren wurden mit den Aktivierungsfaktoren von DegP, das als Positivkontrolle eingesetzt wurde, verglichen (siehe Tab. 4-8).

Im Enzymtest mit dem Substrat SPMFKGV-pNA ergaben sich für wt-DegP unter den eingesetzten Bedingungen Aktivierungsfaktoren von 2,5 (DNRDGVVYFF), 10 (β -Casein) und 15,9 ($v\beta$ -Casein) (siehe Tab. 4-8). Während die Aktivierungsfaktoren der Mutante DegP_{M268Q} in der Tendenz mit denen des Wildtyps übereinstimmten, konnten die Mutanten DegP_{R262A}, DegP_{L265N}, DegP_{I267N} und DegP_{R262A,V328S} mit keinem der DegP-Aktivatoren aktiviert werden. Im Gegensatz zu DegP_{L324N}, das nur noch mit dem Peptid DNRDGNVYFF aktiviert werden konnten, führte nur die Inkubation von DegP_{V328S}, DegP _{Δ PDZ2} oder DegP _{Δ PDZ1+2} mit β -Casein oder $v\beta$ -Casein zu einer im Vergleich zum Wildtyp verminderten Aktivierung.

Bei dem Substrat DPMFKLV-pNA handelt es sich um ein optimiertes pNA-Substrat, das nach Abspaltung des para-Nitroanilins selbst als Aktivator von DegP dient (siehe 4.1.2, 4.1.3). Die Inkubation mit dem schwachen Aktivator DNRDGNVYFF führt daher in diesem Fall nicht zu einer Aktivierung von DegP im pNA-Enzymtest (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Gründen wurden in diesem Zusammenhang ausschließlich β -Casein und $v\beta$ -Casein eingesetzt. Dabei ergaben sich für DegP unter den eingesetzten Bedingungen Aktivierungsfaktoren von 2,2 (β -Casein) und 2,4 ($v\beta$ -Casein) (siehe Tab. 4-8). Während DegP_{R262A}, DegP_{L265N}, DegP_{I267N}, DegP_{L324N} und DegP_{R262A,V328S} nicht durch diese Aktivatoren aktiviert wurden, zeigten die anderen PDZ-Mutanten eher erhöhte Aktivierungsfaktoren. Dabei wurden DegP_{M268Q}, DegP_{V328S} und DegP _{Δ PDZ2} durch beide Aktivatoren aktiviert, DegP _{Δ PDZ1+2} hingegen nur durch β -Casein.

Tab. 4-8: Aktivierung der DegP PDZ-Mutanten im pNA-Enzymtest

Für den Enzymtest mit dem Substrat SPMFKGV-pNA wurden 1 μM des zu testenden Proteins, für den Test mit dem Substrat DPMFKLV-pNA 0,1 μM des zu testenden Proteins eingesetzt. Das Substrat wurde in einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzt. Von den Aktivatoren wurden folgende Konzentrationen/Mengen eingesetzt: 50 μM DNRLGLVYFF, 3 μM (entspricht 5 μg) β -Casein und 5 μg verdautes β -Casein ($v\beta$ -Casein).

Die zu testenden Mutanten wurde zur Bestimmung des Aktivierungsfaktors 5 min bei 37°C mit dem putativen Aktivator im Reaktionspuffer vorinkubiert (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0). Anschließend wurde das pNA-Substrat zugegeben und die Absorption für 1 h bei 37°C bestimmt. Aus den Werten ließ sich die spezifische Aktivität und somit der Aktivierungsfaktor errechnen. Dabei wurde auf die Proteinprobe ohne Aktivator normiert. -: keine Aktivierung. ^a 1 entspricht einer spezifischen Aktivität von 15 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹ (SPMFKGV-pNA) bzw. 1400 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹ (DPMFKLV-pNA). Die Standardabweichung lag unter 20%.

Mutante	x fache Aktivierung [Normiert] ^a				
	SPMFKGV-pNA +			DPMFKLV-pNA +	
	DNRDGNVYFF	β -Casein	$v\beta$ -Casein	β -Casein	$v\beta$ -Casein
DegP	2,5	10	15,9	2,2	2,4
DegP _{R262A}	-	-	-	-	-
DegP _{L265N}	-	-	-	-	-
DegP _{I267N}	-	-	-	-	-
DegP _{M268Q}	2,5	7,6	11	20	4,4
DegP _{L324N}	2,2	-	-	-	-
DegP _{V328S}	-	-	1,9	3	4,2
DegP _{R262A, V328S}	-	-	-	-	-
DegP _{ΔPDZ2}	-	2,6	4	9	2,4
DegP _{ΔPDZ1+2}	-	3	1,6	4	-

Die Ergebnisse verdeutlichen die wichtige Rolle der PDZ1-Domäne für die Aktivierung von DegP. Dabei führen bestimmte Punktmutationen zu einem vollständigen Defekt in der Aktivierbarkeit. Die Deletionsmutante DegP _{Δ PDZ2} wird in beiden Enzymtests durch β -Casein und $v\beta$ -Casein aktiviert. Dies untermauert die Erkenntnisse, dass β -Casein nicht an die PDZ2-Domäne bindet und diese nicht essentiell ist für die proteolytische Aktivität und auch nicht für die Aktivierung von DegP. Interessanterweise lies sich auch die Deletionsmutante DegP _{Δ PDZ1+2} in beiden Tests durch β -Casein aktivieren. Da die Grundaktivität dieser Mutante allerdings sehr gering und kaum messbar ist, scheint es sich hierbei um einen unspezifischen Effekt zu handeln.

4.2.2.5 Oligomerisierung von DegP PDZ-Mutanten

Um die Rolle der PDZ-Domänen für die Oligomerisierung von DegP zu ermitteln, sollten die PDZ-Mutanten in Cross-Link Analysen eingesetzt werden. Um die Interferenz von Abbaufragmenten der Autoproteolyse von DegP und verschiedenen Oligomeren zu umgehen, wurden die proteolytisch inaktiven Varianten (S210A) getestet. Da DegP _{Δ PDZ1+2} keinerlei Autoproteolyse zeigte, wurde in diesem Fall nicht die proteolytisch inaktive Variante

eingesetzt. Zum Vergleich wurde DegP_{S210A} ebenfalls untersucht. Aufgrund der guten Löslichkeit und der Ergebnisse aus 4.1.4.1 wurde DPMFKLV als aktivierendes Peptid gewählt.

In Abwesenheit des Aktivators lag DegP_{S210A} hauptsächlich als Trimer und Hexamer vor (siehe Abb. 4-19). Die Addition des Aktivators in steigenden Konzentrationen führte zu einer vermehrten Ausbildung des 12mer und 24mer und einer Abnahme der Menge an Trimer und Hexamer. Schon bei einer eingesetzten Menge von 100 μ M lag ein Großteil des Proteins als 24mer vor. Während sich DegP_{M268Q,S210A} wie DegP_{S210A} verhielt, lag die Mutante DegP_{I267N,S210A} ausschließlich als Monomer und Trimer vor (Daten nicht gezeigt). Wie in Abb. 4-19 zu sehen, zeigten DegP_{R262A,S210A}, DegP_{L265N,S210A}, DegP_{L324N,S210A}, DegP_{V328S,S210A} und DegP_{R262A,V328S,S210A} ein im Vergleich zu DegP_{S210A} verändertes Verhalten im Cross-Link Experiment. Während die Zugabe des Aktivators zu DegP_{R262A,V328S,S210A} in keiner Konzentration zu einem Switch in höhere Oligomere resultierte, waren bezüglich der anderen Mutanten höhere Konzentrationen für eine Umlagerung zum 12mer und 24mer notwendig.

Des Weiteren wurde mittels Cross-Link Analysen und Gelfiltrationsexperimenten gezeigt, dass DegP _{Δ PDZ2,S210A} und DegP _{Δ PDZ1+2} hauptsächlich als Monomer und Trimer vorliegen und kein Switch in höhere Oligomere durch die Inkubation mit Aktivatoren hervorgerufen wird (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der Oligomerisierungsanalysen zeigen die wichtige Rolle der PDZ-Domänen für die Oligomerisierung von DegP. Während die Deletion der PDZ-Domänen auch die Bildung des hexameren Zustandes verhindert, führen einzelne Aminosäureaustausche in der PDZ1-Domäne dazu, dass die Ausbildung höherer Oligomere erst durch höhere Aktivatorkonzentrationen ausgelöst wird. Der gemeinsame Austausch der beiden Aminosäuren R262 und V328 sowie der Austausch von I267 führt sogar dazu, dass keine höheren Oligomere (12mer und 24mer) gebildet werden.

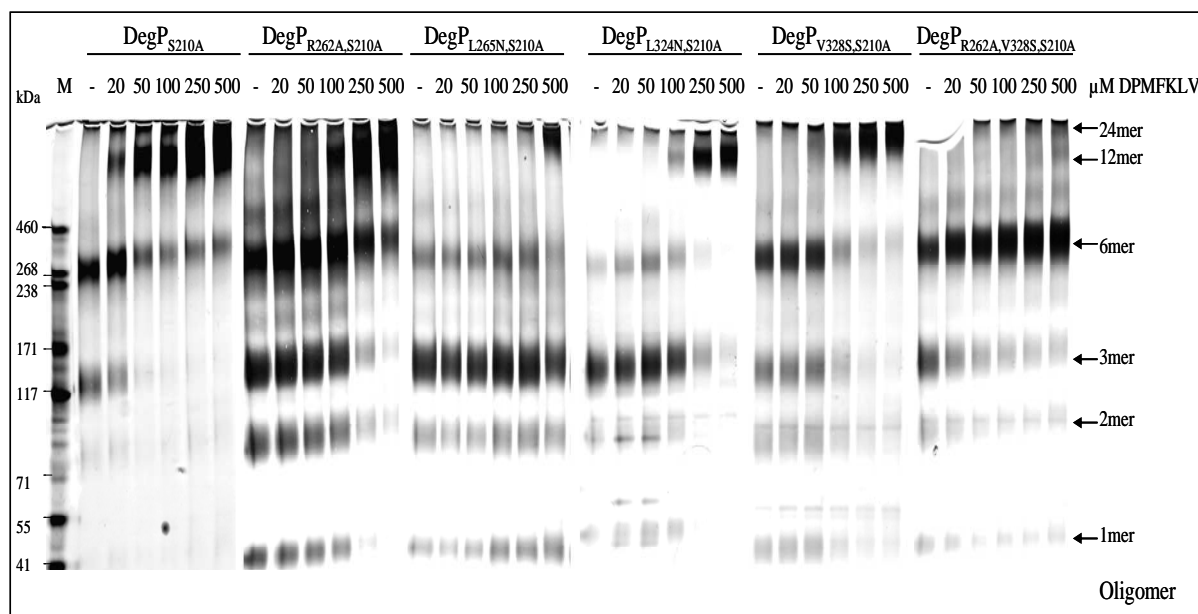


Abb. 4-19: Cross-Link von DegP PDZ-Mutanten in Anwesenheit des Peptids DPMFKLV

Die zu testenden Proteine wurden chemisch denaturiert und rückgefaltet. Anschließend wurden 0,6 μM des Proteins mit verschiedenen Konzentrationen des Peptids DPMFKLV (gelöst in 100% DMSO) für 5 min bei 37°C im Reaktionspuffer (500 mM NaH_2PO_4 pH 8,0) inkubiert. Der Cross-Linker Glutaraldehyd wurde in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) dazugegeben und die Reaktion wurde nach 2 min durch die Zugabe von Tris-HCl pH 7,5 (Endkonzentration 200 mM) gestoppt. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und etwa 133 ng/Spur auf ein Tris-Acetat-Gel (3-8%) aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde eine Silberfärbung durchgeführt.

4.2.2.6 Validierung der Bindung von Liganden an DegP PDZ-Mutanten mittels ITC

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die PDZ-Domänen, primär die PDZ1, eine wichtige Rolle für die Aktivierung von DegP und die damit verbundene Umlagerung zu höheren Oligomeren spielen. Um zu untersuchen, ob der Defekt in der Aktivierbarkeit an der fehlenden Bindung der Aktivatoren an die PDZ-Mutanten liegt, wurden Bindungsstudien durchgeführt. Dazu wurden die Mutanten und ausgewählte Aktivatoren in der ITC eingesetzt und die K_d s bestimmt. Als Aktivatoren wurden die Peptide DNRDGNVYFF und DPMFKLV gewählt. Trotz der Ergebnisse aus 4.2.1.2, die darauf hinweisen, dass β -Casein nicht an die PDZ-Domänen von DegP bindet, wurde auch dieser Aktivator eingesetzt. Die Ergebnisse in diesem Zusammenhang sollten die Daten aus 4.2.1.2 überprüfen, da diese aufgrund der Oligomerisierungsanalysen in 4.2.1.3 nicht eindeutig waren. Um Störsignale durch die Autoproteolyse von DegP zu verhindern, wurden die proteolytisch inaktiven Varianten der Mutanten (S210A) eingesetzt. Das Protein DegP $_{\Delta\text{PDZ1+2}}$ konnte in der ITC untersucht werden, da es keine signifikante proteolytische Aktivität aufweist und daher keine Störsignale hervorruft.

Tab. 4-9 zeigt die ermittelten Dissoziationskonstanten (K_d s) zwischen β -Casein und den getesteten Mutanten, die zwischen den Werten 0,71 μM und 3,75 μM liegen und somit auf

eine starke Bindung hindeuten. Im Vergleich dazu beträgt die K_d zwischen DegP_{S210A} und β -Casein 3,75 μ M. Sogar zwischen der Deletionmutante DegP _{Δ PDZ1+2} und β -Casein wurde eine starke Bindung mit einer K_d von 1,97 μ M gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass β -Casein ausschließlich an die Proteasedomäne von DegP bindet. Da β -Casein neben einem hydrophoben C-Terminus eine geladene N-terminale Domäne mit vier phosphorylierten Serinen besitzt, die dem Protein amphiphile Eigenschaften verleiht (Livney et al., 2004), sind andere Wechselwirkungen zu DegP in diesem Bereich denkbar. Ein Defekt in der Aktivierung durch den Aktivator β -Casein kann somit nicht über die fehlende Bindung des Aktivators an die PDZ-Mutanten erklärt werden. Die leichten Abweichungen der Bindekonstanten voneinander kommen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch kleine Unterschiede in der Reinheit der Proteinproben zustande.

Tab. 4-9: Bindungsaffinitäten zwischen β -Casein und DegP PDZ-Mutanten

Die Bestimmung der Bindekonstanten von β -Casein an DegP_{S210A} und andere proteolytisch inaktive DegP PDZ- Mutanten wurde mittels ITC bei 37°C durchgeführt. Dazu wurden Ligand und Protein in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8,0 gelöst. Während das Protein 20 μ M eingesetzt wurde, variierte die Konzentration des Liganden je nach Stärke der Bindung. Die Daten wurden nach dem Modell einer Bindestelle gefittet und die ermittelten Bindekonstanten (K_d) sind in der Tabelle dargestellt.

Mutante	K_d [μ M]
DegP _{S210A}	3,75
DegP _{R262A,S210A}	1,00
DegP _{L265N,S210A}	1,82
DegP _{I267N,S210A}	2,00
DegP _{M268Q,S210A}	3,75
DegP _{L324N,S210A}	0,71
DegP _{V328S,S210A}	2,59
DegP _{R262A,V328S,S210A}	1,49
DegP _{ΔPDZ2,S210A}	3,53
DegP _{ΔPDZ1+2}	1,97

Abb. 4-20 zeigt beispielhaft die ITC-Kurven von DegP _{Δ PDZ1+2} und β -Casein sowie von der Punktmutante DegP_{L265N,S210A} und β -Casein.

Anders als bei dem Aktivator β -Casein ergaben sich keine signifikanten Bindungen zwischen dem Peptid DNRDGNVYFF und den PDZ-Mutanten (siehe Tab. 4-10). Lediglich zwischen DegP _{Δ PDZ2} und DNRDGNVYFF konnte eine sehr schwache Bindung mit einer K_d von 119,05 μ M gemessen werden. Im Vergleich dazu betrug die K_d von DegP_{S210A} und DNRDGNVYFF 16,37 μ M. Die Ergebnisse zeigen, dass einzelne Punktmutationen in der PDZ1-Domäne die Bindung zu dem Aktivatorpeptid DNRDGNVYFF verhindern. Dieses Peptid bindet somit eindeutig an die PDZ1-Domäne von DegP. Die Deletion der Domäne

PDZ2 führt zu einer Schwächung der Bindung. Dies kann an einer stabilisierenden Funktion der PDZ2-Domäne auf das Protein oder auf die Bindung liegen.

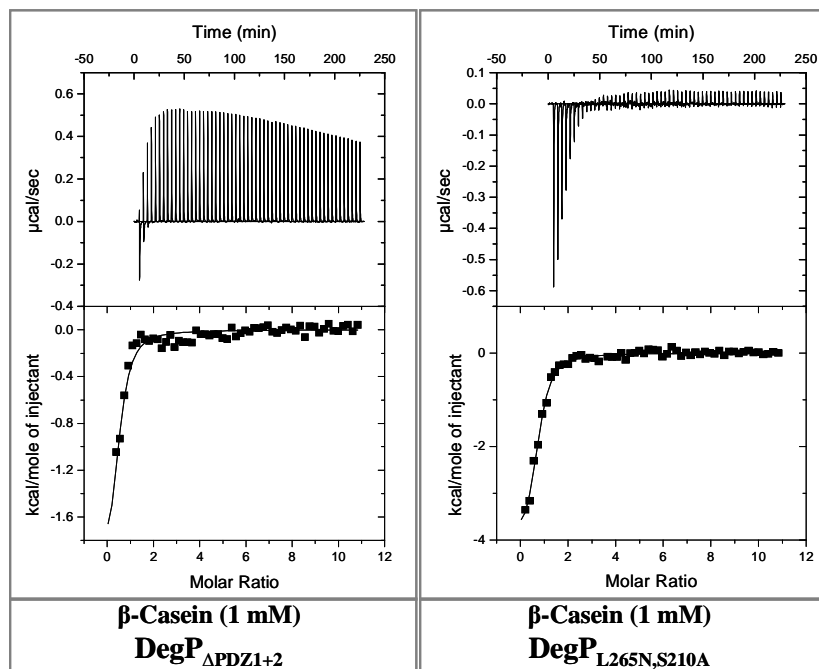


Abb. 4-20: ITC mit β -Casein und DegP PDZ-Mutanten

Die Bestimmung der Bindekonstanten von β -Casein an DegP_{S210A} und andere proteolytisch inaktive DegP PDZ- Mutanten wurde mittels ITC bei 37°C durchgeführt. Dazu wurden Ligand und Protein in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8 gelöst. Während das Protein 20 μ M eingesetzt wurde, variierte die Konzentration des Liganden je nach Stärke der Bindung. In der Abbildung sind beispielhaft zwei Bindekurven gezeigt (Fit: „one set of sites“). Dabei handelt es sich zum einen um die Bindung zwischen DegP_{ΔPDZ1+2} und β -Casein, zum anderen um die Bindung zwischen DegP_{L265N,S210A} und β -Casein. Das β -Casein wurde 1 mM eingesetzt.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich aus den ITC-Messungen mit dem Aktivator DPMFKLV. Auch hier konnte keine signifikante Bindung zwischen dem Aktivatorpeptid und den PDZ-Mutanten bestimmt werden (siehe Tab. 4-10). Lediglich zwischen DegP_{ΔPDZ2} und DPMFKLV konnte eine sehr schwache Bindung mit einer K_d von 82,64 μ M gemessen werden. Die K_d zwischen DegP_{S210A} und dem Aktivator betrug hingegen 4,98 μ M. Diese Ergebnisse untermauern die Daten aus den ITC-Messungen mit dem Aktivator DNRDGNVYFF und zeigen, dass auch DPMFKLV eindeutig an die PDZ1-Domäne von DegP bindet.

Tab. 4-10: Bindungsaffinitäten zwischen DNRDGNVYFF oder DPMFKLV und den DegP PDZ-Mutanten

Die Bestimmung der Bindekonstanten von DNRDGNVYFF und DPMFKLV an DegP_{S210A} und andere proteolytisch inaktive DegP PDZ- Mutanten wurde mittels ITC bei 37°C durchgeführt. Dazu wurden Ligand und Protein in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8 gelöst. Während das Protein 20 µM eingesetzt wurde, variierte die Konzentration des Liganden je nach Stärke der Bindung. Die Daten wurden nach dem Modell einer Bindestelle gefittet und die ermittelten Bindekonstanten (K_d) sind in der Tabelle dargestellt. -: keine signifikante Bindung.

Mutante	DNRDGNVYFF K_d [µM]	DPMKKLV K_d [µM]
DegP _{S210A}	16,37	4,98
DegP _{R262A,S210A}	-	-
DegP _{L265N,S210A}	-	-
DegP _{I267N,S210A}	-	-
DegP _{M268Q,S210A}	-	-
DegP _{L324N,S210A}	-	-
DegP _{V328S,S210A}	-	-
DegP _{R262A,V328S,S210A}	-	-
DegP _{ΔPDZ2,S210A}	119,05	82,64
DegP _{ΔPDZ1+2}	-	-

4.3 Mutationsanalyse des Loop 3 von DegP

Studien an der HtrA-Protease DegS haben gezeigt, dass der Loop L3 eine wichtige Rolle bei der allosterischen Aktivierung des Proteins spielt (Walsh *et al.*, 2003; Wilken *et al.*, 2004; Sohn *et al.*, 2007, Hasselblatt *et al.*, 2007). Diese wird initiiert durch die Bindung von Aktivatorpeptiden an die PDZ-Domäne. Die zusätzliche Wechselwirkung des Aktivators (Aminosäure an Position -1) mit dem Loop L3 löst eine Konformationsänderung des Loops aus, die weitere Umstrukturierungen in der Proteasedomäne initiiert. Das Resultat ist ein funktionsfähiges proteolytisches Zentrum.

Die Homologie zu DegS und die Tatsache, dass auch DegP allosterisch über die Bindung von Aktivatoren an der PDZ1-Domäne aktiviert werden kann, legen nahe, dass der Loop L3 auch in DegP eine wichtige Rolle für den Aktivierungsmechanismus spielt. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden L3-Punktmutanten konstruiert, die anschließend gereinigt und charakterisiert wurden. Außerdem wurde ebenfalls die L3-Deletionsmutante DegP_{Δ189-195} analysiert. Während die Aminosäuren an den Positionen 189-195 den eigentlichen Loop darstellen, handelt es sich bei R187, S188, E196, N197 und F198 um die Aminosäuren, die den eher stabilen Stamm des Loops L3 in DegP bilden. Aus beiden Regionen wurden insgesamt neun Aminosäuren ausgewählt und diese gegen Alanin ausgetauscht. Bei den so entstandenen Punktmutanten handelte es sich um DegP_{R187A}, DegP_{S188A}, DegP_{G189A}, DegP_{L190A}, DegP_{N191A}, DegP_{E193A}, DegP_{E196A}, DegP_{N187A} und DegP_{F198A}. Für folgende

Oligomerisierungsanalysen und Bindungsstudien wurden ebenfalls die proteolytisch inaktiven Varianten dieser Mutanten (S210A-Mutanten) konstruiert, gereinigt und charakterisiert.

4.3.1 Reinigung der L3-Mutanten von DegP

Die L3-Mutanten DegP_{R187A}, DegP_{S188A}, DegP_{G189A}, DegP_{L190A}, DegP_{N191A}, DegP_{E193A}, DegP_{E196A}, DegP_{N187A}, DegP_{F198A} und DegP_{Δ189-195} und die proteolytisch inaktiven Varianten wurden aus dem Stamm MA001 gereinigt und anschließend auf dem Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert (siehe Abb. 4-21). Auf die Konstruktion der proteolytisch inaktiven Variante der Deletionsmutante wurde vorerst verzichtet. Es wurden moderate Ausbeuten von 7 bis 15 mg pro Liter Flüssigkultur erreicht. Die Reinheit betrug bei allen Proteinen >95% und die Autoproteolyse bezüglich der proteolytisch aktiven Mutanten lag bei <5%.

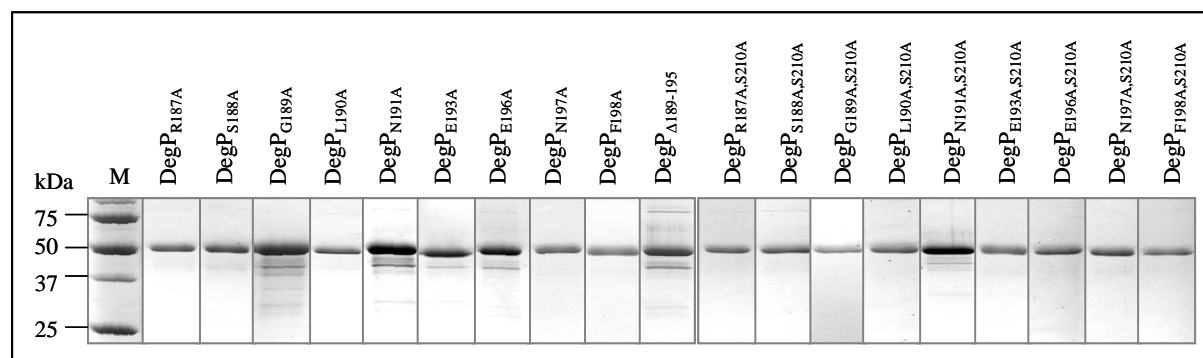


Abb. 4-21: Reinigungen der Loop3-Mutanten von DegP

Die Expression der L3-Mutanten von DegP erfolgte über Nacht bei 20°C und wurde mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Reinigungen erfolgten analog zu der Reinigung von DegP und DegP_{S210A} (4.1.1) unter nativen Konditionen über Ni-TED-Säulen. Der Nachweis erfolgte über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blau Färbung; M: Proteinmarker.

4.3.2 *In vivo* Komplementation eines *degP*⁻ Stammes durch DegP L3-Mutanten

Zur Untersuchung der Funktion der L3-Mutanten *in vivo* wurden Komplementationsstest durchgeführt und die Ergebnisse semiquantitativ ausgewertet (vergleiche 4.2.2.2).

Die Expression der Mutanten DegP_{S188A}, DegP_{N191A}, DegP_{E193A} und DegP_{N197N} führte zu einem mit dem DegP-Wildtyp vergleichbaren Wachstum (siehe Tab. 4-11). Dahingegen komplementierten DegP_{R187A}, DegP_{F198A} und DegP_{Δ189-195} die Temperatursensitivität nicht. Während die Expression von DegP_{G189A} und DegP_{L190A} zu einem mäßigen Wachstum führte, komplementierte DegP_{E196A} eher schlecht.

Die Daten zeigen, dass bestimmte Punktmutationen im Loop L3 zu einem vollständigen Funktionsverlust in der *in vivo* Komplementation eines *degP*⁻ Stamms führen. Dabei liegen diese Mutationen im Stamm des Loop 3. Zu einer stark eingeschränkten Funktion von DegP

führt außerdem der Austausch der Aminosäure E196, die sich im eigentlichen Loop befindet. Die Deletion des Loops L3 führt zum vollständigen Funktionsverlust.

Tab. 4-11: Komplementation der Hitzesensibilität durch DegP L3-Mutanten

Zum Testen der *in vivo* Komplementation der Hitzesensibilität wurde der Stamm KU98 (*degP*) mit den entsprechenden Plasmiden auf Agarplatten mit 1μM IPTG getropft (2 μl verschiedener Verdünnungen) und 16 h bei 43°C inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum bewertet.

+++ : sehr gutes Wachstum / vollständige Komplementation; ++ : gutes Wachstum / leicht verringerte Komplementation; + : mäßiges Wachstum / moderate Komplementation; - : geringes Wachstum / schlechte Komplementation; 0 : kein Wachstum / keine Komplementation

Stamm	Protein	Komplementation
KU98 (pCS19)	-	0
KU98 (pCS20)	DegP	++
KU98 (pCS21)	DegP _{S210A}	-
KU98 (pNM2)	DegP _{R187A}	0
KU98 (pNM3)	DegP _{S188A}	++
KU98 (pNM4)	DegP _{G189A}	+
KU98 (pNM5)	DegP _{L190A}	+
KU98 (pNM6)	DegP _{N191A}	++
KU98 (pNM7)	DegP _{E193A}	++
KU98 (pNM8)	DegP _{E196A}	-
KU98 (pNM9)	DegP _{N197A}	++
KU98 (pNM10)	DegP _{F198A}	0
KU98 (pAB22)	DegP _{Δ189-195}	0

4.3.3 Die proteolytische Aktivität von DegP L3-Mutanten

Um die Proteasefunktion der L3-Mutanten zu untersuchen, sollten diese in Enzymtests mit den Substraten SPMFKGV-pNA, DPMFKLV-pNA und β-Casein untersucht werden. Außerdem sollte der Caseinabbau auf Zymogramm-Gelen analysiert werden.

4.3.3.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität von DegP L3-Mutanten im pNA-Enzymtest

Die spezifische Aktivität der L3-Mutanten wurde in pNA-Enzymtests ermittelt (vergleiche 4.2.2.3.1). Abb. 4-22 zeigt die Ergebnisse der Tests mit dem Substrat SPMFKGV-pNA. Alle L3-Mutanten zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp stark eingeschränkte spezifische Aktivität. Während die Aktivität der Mutanten DegP_{N191A} und DegP_{E193A} 35% bzw. 17% der Wildtypaktivität betrug, lagen die Werte der anderen Mutanten unter 10%. DegP_{R187A}, DegP_{E196A}, DegP_{F198A} und DegP_{Δ189-195} sind proteolytisch inaktiv.

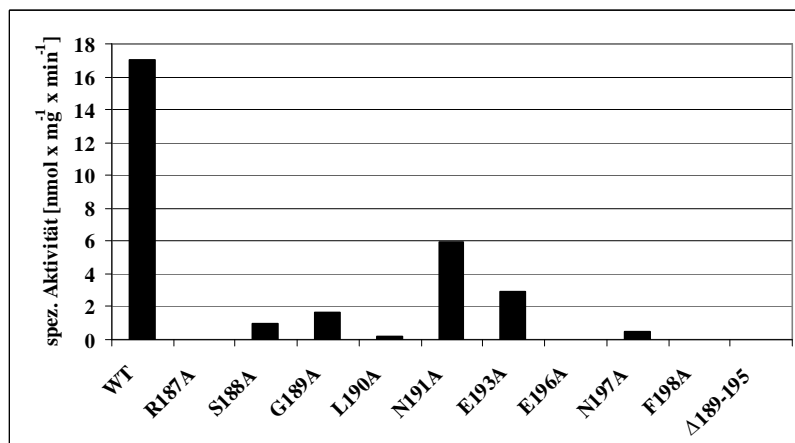


Abb. 4-22: Bestimmung der spezifischen Aktivität der Loop 3-Mutanten von DegP mit dem Substrat SPMFKGV-pNA

Dargestellt ist die spezifische Aktivität von DegP Loop 3-Mutanten, die im Enzymtest mit dem Substrat SPMFKGV-pNA ermittelt wurde. Dazu wurden 0,5 mM des Substrats mit 1 μ M DegP in 50 mM NaH₂PO₄, pH 8 für 1 h bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 405 nm über die Zeit gemessen. Aus den ermittelten Werten wurde die spezifische Aktivität ermittelt. Die Standardabweichung lag unter 20%.

Auch im pNA-Enzymtest mit DPMFKLV-pNA zeigten sich in der Tendenz ähnliche Ergebnisse (siehe Abb. 4-23). Alle Mutanten waren in ihrer Proteaseaktivität stark eingeschränkt. Die stärksten Aktivitäten wiesen in diesem Fall die Mutanten DegP_{S188A} und DegP_{E193A} mit Werten von 23% bzw. 50%, gemessen am Wildtyp, auf. Auch hier waren DegP_{R187A}, DegP_{E196A}, DegP_{F198A} und DegP_{Δ189-195} proteolytisch inaktiv. Zusätzlich zeigte auch die Mutante DegP_{G189A} keinerlei Proteaseaktivität. Die Werte von DegP_{L190A}, DegP_{N191A} und DegP_{N197A} lagen auch in diesem Test bei <10% relativ zur wildtypischen Aktivität.

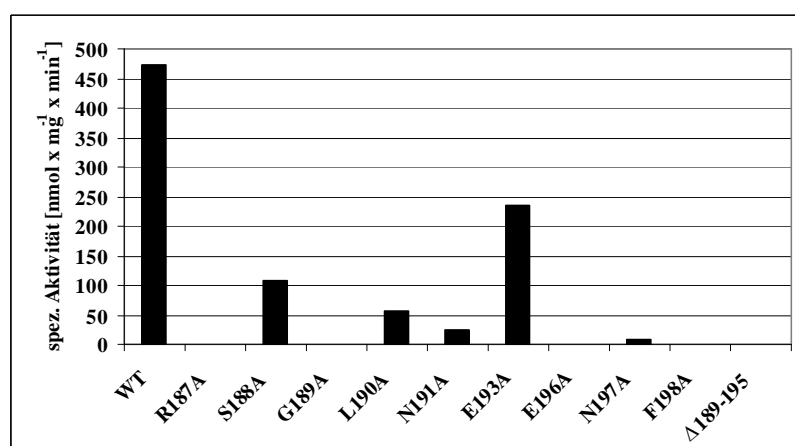


Abb. 4-23: Bestimmung der spezifischen Aktivität der Loop 3-Mutanten von DegP mit dem Substrat DPMFKLV-pNA

Dargestellt ist die spezifische Aktivität von DegP Loop 3-Mutanten, die im Enzymtest mit dem Substrat DPMFKLV-pNA ermittelt wurde. Dazu wurden 0,5 mM des Substrats mit 0,1 μ M DegP in 50 mM NaH₂PO₄, pH 8 für 1 h bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 405 nm über die Zeit gemessen. Aus den ermittelten Werten wurde die spezifische Aktivität ermittelt. Die Standardabweichung lag unter 20%.

Die Ergebnisse verdeutlichen die wichtige Rolle des Loops L3 für die Proteaseaktivität von DegP. Eine Deletion des Loops, aber auch der Austausch bestimmter Aminosäuren führt zum vollständigen Verlust der Proteaseaktivität. Andere Aminosäureaustausche verringern die Aktivität enorm.

4.3.3.2 Die Hydrolyse von Casein im Zymogramm durch DegP L3-Mutanten

Um den Abbau von Casein durch die L3-Mutanten zu beobachten wurden diese in Zymogrammen untersucht und der Caseinabbau semiquantitativ bewertet (vergleiche 4.2.2.3.2). Ausschließlich DegP_{E193A} baute Casein vergleichbar zum Wildtyp ab (siehe Abb. 4-24). DegP_{R187A}, DegP_{F198A} und DegP_{Δ189-195} bauten Casein hingegen nicht ab. Die übrigen L3-Mutanten zeigten einen im Vergleich zum Wildtyp sehr geringen bis leicht reduzierten Caseinabbau (siehe Abb. 4-24). Unterstützend zu den Ergebnissen der pNA-Enzymtests verdeutlichen die Ergebnisse die wichtige Rolle des Loop L3 für die proteolytische Aktivität von DegP. Sowohl die Deletion des Loop 3 als auch Aminosäureaustausche im Stamm des Loop 3 führen zum Verlust der Proteaseaktivität.

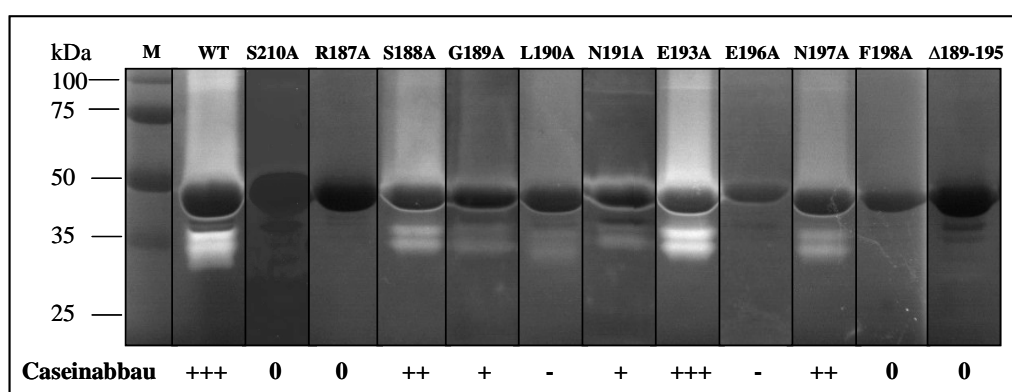


Abb. 4-24: Zymogramm von DegP L3-Mutanten

Dargestellt ist ein Zymogramm-Gel nach Anfärbung des Caseins mit Coomassie-Blau. Dazu wurden 10 µg der zu testenden Proteine auf ein nicht denaturierendes Zymogramm-Gel aufgetragen, das Casein enthielt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine renaturiert. Die Entwicklung erfolgte über Nacht bei 37°C. Der Caseinabbau wurde anschließend bewertet. 0: kein Caseinabbau; - sehr geringer Caseinabbau im Vergleich zum Wildtyp; + geringer Caseinabbau im Vergleich zum Wildtyp; ++ leicht reduzierter Caseinabbau im Vergleich zum Wildtyp; +++ wildtypischer Caseinabbau.

4.3.3.3 Die Hydrolyse von β-Casein durch DegP L3-Mutanten

Für die Untersuchung der Proteaseaktivität der L3-Mutanten wurde des Weiteren β-Casein in Enzymtests eingesetzt (vergleiche 4.2.2.3.3). Die Ergebnisse sind in Abb. 4-25 dargestellt und bestätigen die Daten aus den Zymogrammen (siehe 4.3.3.2). Auch in diesem Enzymtest zeigte ausschließlich die Mutante DegP_{E193A} einen β-Caseinabbau, der dem des Wildtyps vergleichbar (ca. 21 min) war. Während DegP_{R187A}, DegP_{F198A} und DegP_{Δ189-195} auch in

diesem Test proteolytisch inaktiv waren, zeigten die übrigen Mutanten eine stark eingeschränkte Proteaseaktivität, da sie das eingesetzte β -Casein erst nach längerer Zeit (24-70 min) abbauten als der Wildtyp (siehe Abb. 4-25).

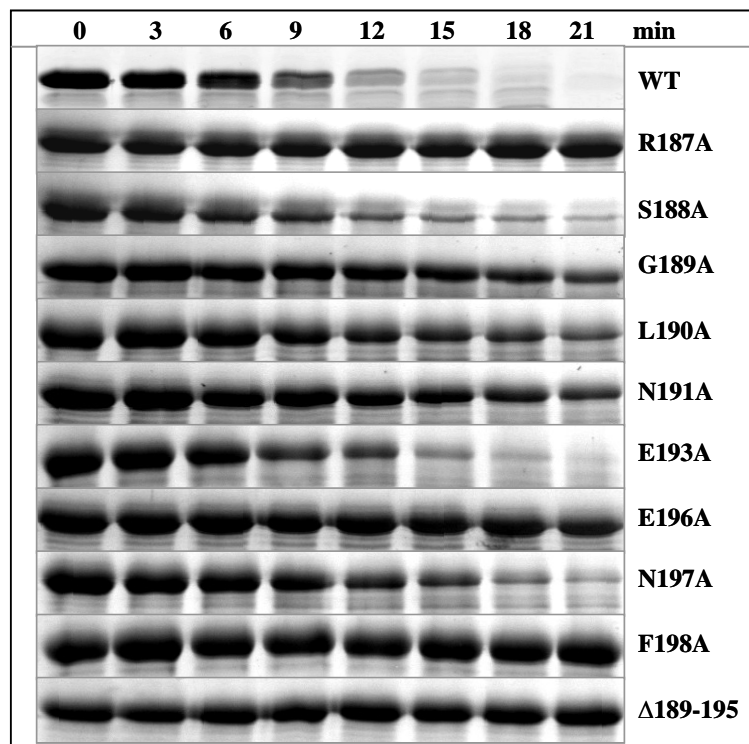


Abb. 4-25: β -Casein Verdau durch DegP L3-Mutanten

Dargestellt ist der Abbau von β -Casein durch DegP und DegP Loop 3-Mutanten über die Zeit. Dazu wurde 1 μ M DegP mit 20 μ M β -Casein in 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8 bei 37°C inkubiert. Alle drei Minuten wurden 20 μ l entnommen und eine Acetonfällung durchgeführt. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Proteinnachweis mittels einer Coomassie-Blau Färbung.

4.3.4 Aktivierung von DegP L3-Mutanten im pNA-Assay

Um die Rolle des Loop 3 und einzelner Aminosäuren dieses Loops für die Aktivierung von DegP zu entschlüsseln, wurden pNA-Enzymtests mit verschiedenen Aktivatoren durchgeführt (vergleiche 4.2.2.4). Die Aktivierungsfaktoren wurden ermittelt und in Relation gesetzt zu den Daten des Wildtyps (siehe Tab. 4-12).

Im pNA-Enzymtest mit dem Substrat SPMFKGV-pNA stimmten die Aktivierungsfaktoren der Mutanten DegP_{S188A}, DegP_{L190A}, DegP_{E193A} und DegP_{N197A} in der Tendenz mit denen des Wildtyps überein und zeigten mit β -Casein und v β -Casein sogar etwas höhere Aktivierungsfaktoren. Während sich DegP_{G189A} und DegP_{N191A} nur noch mit β -Casein und v β -Casein aktivieren ließen, waren die Proteine DegP_{R187A}, DegP_{E196A}, DegP_{F198A} und DegP_{Δ189-195} mit keinem der Aktivatoren aktivierbar. Auch im Enzymtest mit dem Substrat DPMFKLV-pNA zeigten die Mutanten DegP_{S188A}, DegP_{L190A}, DegP_{E193A} und DegP_{N197A} eine Aktivierbarkeit, die teilweise in höheren Aktivierungsfaktoren resultierte als die Aktivierung

des Wildtyp-DegP. In diesem Test wurde auch DegP_{N191A} besser als der Wildtyp aktiviert. Sowohl DegP_{R187A} als auch DegP_{Δ189-195} wurden nicht aktiviert. Abweichende Daten zeigten sich für DegP_{F198A}, das durch vβ-Casein aktiviert werden konnte. Da die Grundaktivität der Mutante bei 0,5% der Wildtypaktivität lag, war der Wert nach der Aktivierung allerdings immer noch sehr gering. Aufgrund der überaus geringen Grundaktivität von DegP_{G189A} konnte kein signifikanter Aktivierungsfaktor für die Aktivierung durch β-Casein ermittelt werden.

Tab. 4-12: Aktivierung der DegP L3-Mutanten im pNA-Enzymtest

Für den Enzymtest mit dem Substrat SPMFKGV-pNA wurden 1 μM des zu testenden Proteins, für den Test mit dem Substrat DPMFKLV-pNA 0,1 μM des zu testenden Proteins eingesetzt. Das Substrat wurde 0,5 mM eingesetzt. Von den Aktivatoren wurden folgende Konzentrationen/Mengen eingesetzt: mit 50 μM DNRLGLVYFF; 3 μM (entspricht 5 μg) β-Casein; 5 μg vβ-Casein. Die zu testende Mutante wurde zur Bestimmung des Aktivierungsfaktors 5 min bei 37°C mit dem putativen Aktivator im Reaktionspuffer vorinkubiert (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0). Dann wurde das pNA-Substrat zugegeben und die Absorption für 1 h bei 37°C bestimmt. Aus den Werten ließ sich die spezifische Aktivität und somit der Aktivierungsfaktor errechnen. Dabei wurde auf die Proteinprobe ohne Aktivator normiert. *: Es gab einen Anstieg der Aktivität. Da die Grundaktivität allerdings bei 0 lag, war die Aktivierung nicht auszuwerten. -: keine Aktivierung. ^a 1 entspricht einer spezifischen Aktivität von 15 nmol x mg⁻¹ x min⁻¹ (SPMFKGV-pNA) bzw. 1400 nmol x mg⁻¹ x min⁻¹ (DPMFKLV-pNA). Die Standardabweichung lag unter 20%.

Mutante	x fache Aktivierung [Normiert] ^a				
	SPMFKGV-pNA +			DPMFKLV-pNA +	
	DNRDGNVYFF	β-Casein	vβ-Casein	β-Casein	vβ-Casein
DegP	2,5	10	15,9	2,2	2,4
DegP _{R187A}	-	-	-	-	-
DegP _{S188A}	1,5	15	17	5	3,6
DegP _{G189A}	-	17	11	*	-
DegP _{L190A}	1,2	19	13	6	8,3
DegP _{N191A}	-	15	6	30	5
DegP _{E193A}	3	12	10	2	3,3
DegP _{E196A}	-	-	-	-	-
DegP _{N197A}	1,5	14	19	34	6
DegP _{F198A}	-	-	-	-	3,5
DegP _{Δ189-195}	-	-	-	-	-

Die hier erläuterten Daten verdeutlichen die wichtige Rolle der Aminosäuren R187, E196 und F198 für die allosterische Aktivierung von DegP durch Peptide und Proteine. Der Austausch dieser Aminosäuren und die Deletion des Loop L3 führen zum Verlust der allosterischen Aktivierbarkeit. Des Weiteren ist zu beachten, dass auch die hohen Aktivierungsfaktoren bei den übrigen Mutanten lediglich zu einer spezifischen Aktivität führen, die noch weit unter der jeweiligen wildtypischen Aktivität im nicht aktivierten Zustand liegt (vergleiche 4.3.3.1).

4.3.5 Oligomerisierung von DegP L3-Mutanten

Um die Rolle des Loop L3 für die Ausbildung höherer Oligomere von DegP aufzuklären, sollten Cross-Link Analysen mit steigenden Konzentrationen des Aktivators DPMFKLV durchgeführt werden (vergleiche 4.2.2.5). Dazu wurden die proteolytisch inaktiven Varianten der zu testenden Mutanten eingesetzt. DegP_{S188A,S210A}, DegP_{N191A,S210A}, DegP_{E193A,S210A} und DegP_{N197A,S210A} verhielten sich wie DegP_{S210A} (Daten nicht gezeigt). Die Deletionsmutante DegP_{Δ189-195} lag hingegen ausschließlich als Trimer und Hexamer vor und auch hohe Aktivatorkonzentrationen lösten die Ausbildung höherer Oligomere nicht aus (siehe Abb. 4-26). Die Mutanten DegP_{R187A,S210A}, DegP_{L190A,S210A}, DegP_{E196A,S210A} und DegP_{F198A,S210A} zeigten ein im Vergleich zu DegP_{S210A} verändertes Verhalten in den Cross-Link Analysen, da erst die Zugabe sehr hoher Aktivatorkonzentration zu einem Switch vom Trimer und Hexamer zum 12mer und 24mer führte (siehe Abb. 4-26)

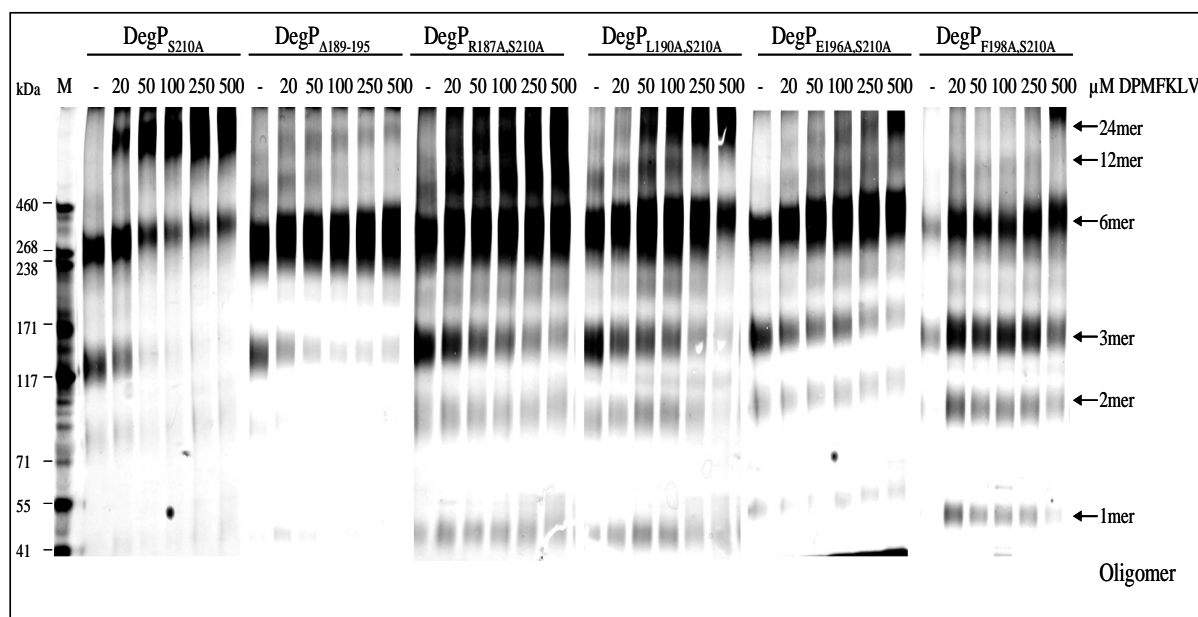


Abb. 4-26: Cross-Link von DegP L3-Mutanten in Anwesenheit des Peptids DPMFKLV

Die zu testenden Proteine wurden chemisch denaturiert und rückgefaltet. Anschließend wurden 0,6 μM des Proteins mit verschiedenen Konzentrationen des Peptids DPMFKLV (gelöst in 100% DMSO) für 5 Minuten bei 37°C im Reaktionspuffer (500 mM NaH₂PO₄ pH 8,0) inkubiert. Der Cross-Linker Glutaraldehyd wurde in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) dazugegeben und die Reaktion wurde nach 2 min durch die Zugabe von Tris-HCl pH 7,5 (Endkonzentration 200 mM) gestoppt. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und etwa 133 ng/Spur auf ein Tris-Acetat-Gel (3-8%) aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde eine Silberfärbung durchgeführt.

Die Ergebnisse verdeutlichen die wichtige Rolle des Loop L3 von DegP für die Ausbildung höherer Oligomere. Während die Deletion des Loop 3 dazu führt, dass auch sehr hohe Aktivatorkonzentrationen nicht zu der Umlagerung zu höheren Oligomeren resultieren, führen

bestimmte Aminosäureaustausche im Loop 3 dazu, dass wesentlich höhere Aktivorkonzentrationen für die Ausbildung des 12mer und 24mer notwendig sind.

4.3.6 Validierung der Bindung von Liganden an DegP L3-Mutanten mittels ITC

Die Charakterisierung des Loop L3 in dieser Arbeit hat ergeben, dass dieser Loop eine wichtige Rolle für die Aktivierung von DegP und die damit verbundene Umlagerung zu höheren Oligomeren spielt. Um zu ermitteln, ob der Defekt in der Aktivierbarkeit bei den untersuchten Mutanten durch die fehlende Bindung der Aktivoren zustande kommt, wurden Bindungsstudien via ITC durchgeführt (vergleiche 4.2.2.6). Als Aktivoren wurden β -Casein, DPMFKLV und DNRDGNVYFF gewählt.

Während die K_d von β -Casein und DegP bei einem Wert von 3,75 μ M lag, wurde eine Dissoziationskonstante von 1,61 μ M für DegP $_{\Delta 189-195}$ und β -Casein bestimmt. Da dieses Ergebnis eindeutig zeigt, dass β -Casein nicht an den Loop 3 von DegP bindet, wurde auf weitere Messungen mit den L3-Punktmutanten und β -Casein verzichtet.

Die Messungen mit dem Aktivator DPMFKLV resultierten in K_d s von 21,79 μ M bis 58,83 μ M (siehe Tab. 4-13). Im Vergleich dazu betrug die K_d zu DegP $_{S210A}$ 4,98 μ M.

Tab. 4-13: Bindungsaffinitäten zwischen dem Peptid DPMFKLV und DegP L3-Mutanten

Die Bestimmung der Bindekonstanten von DPMFKLV an DegP $_{S210A}$ und andere proteolytisch inaktive DegP Loop 3-Mutanten wurde mittels ITC bei 37°C durchgeführt. Dazu wurden Ligand und Protein in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8 gelöst. Während die Proteine 20 μ M eingesetzt wurden, variierte die Konzentration des Liganden je nach Stärke der Bindung. Die Daten wurden nach dem Modell „one set of sites“ gefittet und die ermittelten Bindekonstanten (K_d) sind in der Tabelle dargestellt.

Mutante	K_d [μ M]
DegP $_{S210A}$	4,98
DegP $_{R187A,S210A}$	46,30
DegP $_{S188A,S210A}$	20,38
DegP $_{G189A,S210A}$	57,35
DegP $_{L190A,S210A}$	21,79
DegP $_{N191A,S210A}$	49,77
DegP $_{E193A,S210A}$	50,76
DegP $_{E196A,S210A}$	45,05
DegP $_{N197A,S210A}$	58,83
DegP $_{F198A,S210A}$	55,25
DegP $_{\Delta 189-195}$	52,63

Es konnte somit für alle Punktmutanten und ebenfalls für die Deletionsmutante eine Bindung bestimmt werden, die allerdings wesentlich schwächer ist als die an DegP $_{S210A}$. Die Daten deuten darauf hin, dass der Aktivator nicht ausschließlich an die PDZ1-Domäne bindet (siehe 4.2.2.6), sondern gleichzeitig auch sehr schwach mit Loop 3 wechselwirkt oder dass Kontakte zwischen der PDZ1-Domäne und dem Loop L3 notwendig sind, um eine stabile Bindung des

Liganden zu gewährleisten. Die primäre Bindung an die PDZ1-Domäne ist allerdings notwendig, damit der Ligand ebenfalls an Loop L3 bindet. Die PDZ1-Domäne scheint den Liganden somit in Position für weitere Bindungen zu bringen. Abb. 4-1 zeigt beispielhaft die ITC-Kurven von DPMFKLV mit DegP $_{\Delta 189-195}$ bzw. mit DegP $_{L190A}$.

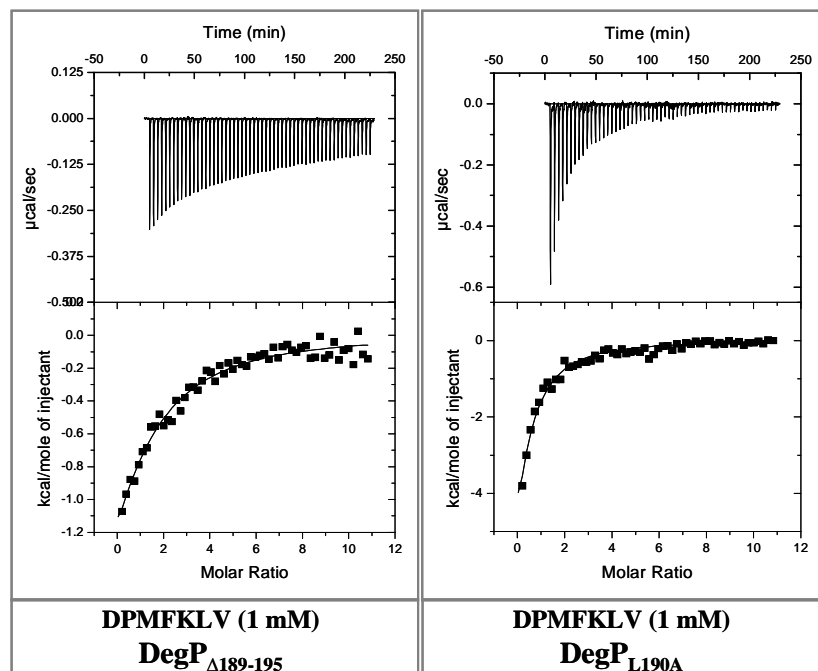


Abb. 4-27: ITC des Peptids DPMFKLV mit DegP $_{\Delta 189-195}$ und DegP $_{L190A}$

Die Bestimmung der Bindekonstante von DPMFKLV an DegP $_{\Delta 189-195}$ und DegP $_{L190A}$ wurde mittels isothermaler Titrationskalorimetrie bei 37°C durchgeführt. Dazu wurden Ligand und Protein in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8 gelöst. Während das Protein 20 μM eingesetzt wurde, wurde der Ligand 1 mM eingesetzt.

Das ITC-Experiment mit DNRDGNVYFF und DegP $_{\Delta 189-195}$ resultierte in einer K_d von 74,07 μM. Vergleichbar dazu wurde eine eher starke Bindungsaffinität zwischen DNRDGNVYFF und DegP $_{S210A}$ mit einer K_d von 16,37 μM bestimmt. Die ermittelte Bindungsaffinität zwischen L3-Deletionsmutante und Dekapeptid untermauert die Ergebnisse aus den ITC-Messungen mit dem Aktivator DPMFKLV. Auf weitere Messungen wurde daher mit diesem Aktivator verzichtet.

4.4 Mutationsanalyse des Loop 2 von DegP

Für die HtrA-Protease DegS wurde gezeigt, dass sich die Konformation des Loop L2 im Zuge der allosterischen Aktivierung stark verändert und diese Umorientierung notwendig ist für die Ausbildung eines intakten proteolytischen Zentrums (Zeth, 2004; Wilken *et al.*, 2004; Hasselblatt *et al.*, 2007).

Der Loop L2 von DegP besteht aus den Aminosäuren 228-238 und bildet einen Teil der S1 Bindetasche, die die Substratspezifität klassischer Serinproteasen bestimmt (Huber *et al.*,

1974; Krojer *et al.*, 2002). Während die Aminosäure I228 Teil dieser S1 Bindetasche ist, gehören die Aminosäuren L229, I236, I238 und F240 zu der Aktivierungsdomäne und interagieren mit F171 und L173 des Loop LD eines benachbarten DegP-Monomer. Um die Rolle des Loop L2 für die Regulation von DegP aufzuschlüsseln wurden L2-Punktmutanten kloniert, gereinigt und charakterisiert. Dabei sollten die Aminosäuren I228, L229, I236, I238 und F240 gegen Alanin ausgetauscht werden.

4.4.1 Reinigung der L2-Mutanten von DegP

Die Mutanten DegP_{I228A}, DegP_{L229A}, DegP_{I236A}, DegP_{I238A}, und DegP_{F240A} konnten erfolgreich aus dem Stamm MA001 gereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Dabei erfolgten die Reinigungen analog zu der Reinigung von DegP und DegP_{S210A} (siehe 4.1.1). Auch die inaktiven Mutanten DegP_{L229A,S210A} und DegP_{L229S,S210A} wurden erfolgreich aus dem Stamm MA001 gereinigt (Daten nicht gezeigt). Bei allen Proteinen wurde eine Reinheit von >95% erzielt.

4.4.2 *In vivo* Komplementation eines *degP*⁻ - Stammes durch DegP L2-Mutanten

Um die Rolle der einzelnen Aminosäuren des Loop 2 für die Fähigkeit der Komplementation eines *degP*⁻ - Stammes zu ermitteln, wurden *in vivo* Komplementationstests mit den gereinigten Mutanten durchgeführt (vergleiche 4.2.2.2). Während die Expression des Proteins DegP_{I236A} zu einem mit dem Wildtyp vergleichbaren Wachstum führte, komplementierten die Mutanten DegP_{L229A}, DegP_{I238A} und DegP_{F240A} die Temperatursensitivität nicht (siehe Tab. 4-14). Die Expression von DegP_{I228A} führte zu einem mäßigen Wachstum der Zellen.

Tab. 4-14: Komplementation der Hitzesensibilität durch die DegP L2-Mutanten

Zum Testen der *in vivo* Komplementation der Hitzesensibilität wurde der Stamm KU98 (*degP*⁻) mit den entsprechenden Plasmiden auf Agarplatten mit 1 µM IPTG getropft (2 µl verschiedener Verdünnungen) und 16 h bei 43°C inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum bewertet. +++: sehr gutes Wachstum / vollständige Komplementation; ++: gutes Wachstum / leicht verringerte Komplementation; +: mäßiges Wachstum / moderate Komplementation; -: geringes Wachstum / schlechte Komplementation; 0: kein Wachstum / keine Komplementation

Stamm	Protein	Komplementation
KU98 (pCS19)	-	0
KU98 (pCS20)	DegP	++
KU98 (pCS21)	DegP _{S210A}	-
KU98 (pDegPI228A)	DegP _{I228A}	+
KU98 (pDegPL229A)	DegP _{L229A}	0
KU98 (pDegPI236A)	DegP _{I236A}	++
KU98 (pDegPI238A)	DegP _{I238A}	0
KU98 (pDegPF240A)	DegP _{F240A}	0

Die Daten verdeutlichen die essentielle Rolle der Aminosäuren L229, I238 und F240 für die *in vivo* Funktion von DegP. Der Austausch der zur S1 Bindetasche gehörenden Aminosäure I228 zu Alanin führt lediglich zu einer Einschränkung der DegP Funktion *in vivo*.

4.4.3 Die proteolytische Aktivität von DegP L2-Mutanten

Um zu ermitteln, ob die Aminosäureaustausche im Loop 2 Einfluss auf die Proteaseaktivität von DegP haben, wurden die L2-Mutanten in pNA-Enzymtests, Enzymtests mit β -Casein und in Zymogrammen eingesetzt.

4.4.3.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität von DegP L2-Mutanten im pNA-Enzymtest

Die spezifische Aktivität der L2-Mutanten wurde in pNA-Enzymtests mit den Substraten SPMFKGV-pNA und DPMFKLV-pNA bestimmt und jeweils mit der Aktivität des Wildtyps verglichen (siehe 4.2.2.3.1). Für die Mutanten DegP_{I228A} und DegP_{I236A} wurde in beiden Enzymtests eine spezifische Aktivität ermittelt, die unter 15% der wildtypischen Aktivität lag (siehe Abb. 4-28). Die übrigen Mutanten (DegP_{L229A}, DegP_{I238A} und DegP_{F240A}) waren proteolytisch inaktiv.

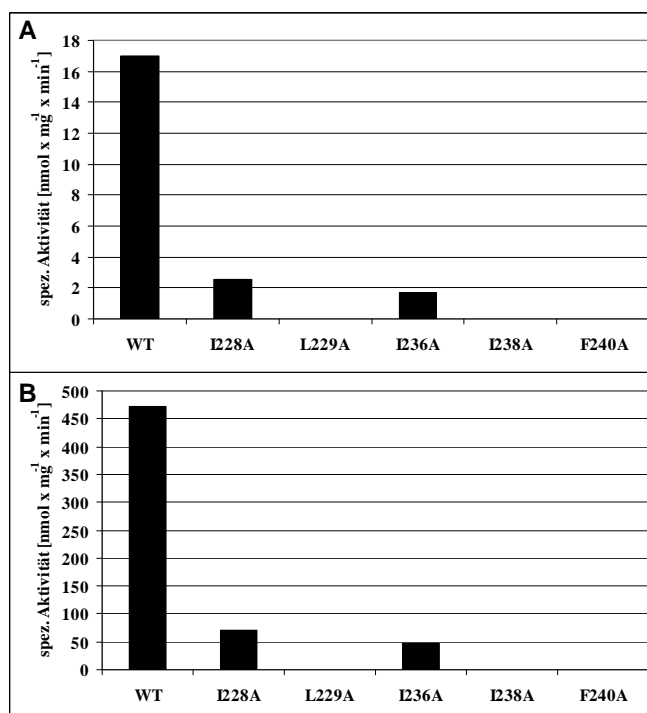


Abb. 4-28: Bestimmung der spezifischen Aktivität der Loop 2-Mutanten von DegP im pNA-Enzymtest

Dargestellt ist die spezifische Aktivität von DegP, die im Enzymtest mit dem Substrat SPMFKGV-pNA (A) und DPMFKLV-pNA (B) ermittelt wurde. Dazu wurden 0,5 mM des Substrats mit 1 μM (A) oder 0,1 μM (B) DegP in 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0 für 1 h bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 405 nm gemessen. Aus den ermittelten Werten wurde die spezifische Aktivität ermittelt. Die Standardabweichung lag unter 20%.

Die Ergebnisse zeigen die überaus wichtige Rolle der Aminosäuren des Loop 2 für die Proteaseaktivität von DegP. Während die hier eingeführten Aminosäureaustausche von L229, I238 und F240 zu einem vollständigen Verlust der spezifischen Aktivität führen, resultieren die Austausche von I228A und I236A in einer proteolytischen Restaktivität von unter 15%.

4.4.3.2 Die Hydrolyse von Casein im Zymogramm durch DegP L2-Mutanten

Um zu untersuchen, ob die L2-Mutanten die Fähigkeit besitzen, Casein zu hydrolysieren, wurden diese im Zymogramm untersucht (vergleiche 4.2.2.3.2). DegP_{I238A} und DegP_{F240A} bauten Casein nicht ab. Dahingegen zeigten die Mutanten DegP_{I228A}, DegP_{L229A} und DegP_{I236A} eine Restaktivität und bauten Casein schwach ab. (siehe Abb. 4-29).

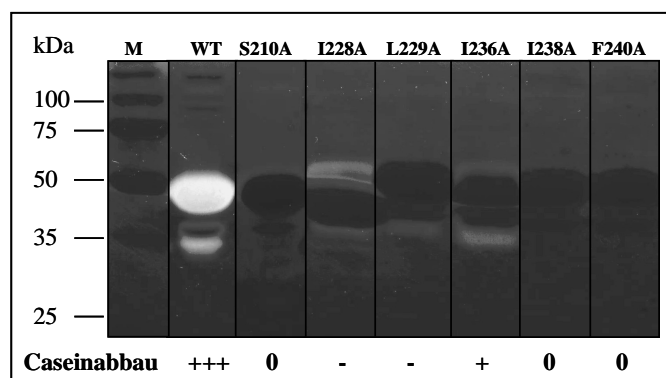


Abb. 4-29: Zymogramm von DegP L2-Mutanten

Dargestellt ist ein Zymogramm-Gel nach Anfärbung des Caseins mit Coomassie-Blau. Dazu wurden 10 µg der zu testenden Proteine auf ein nicht denaturierendes Casein-Zymogramm-Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine renaturiert. Die Entwicklung erfolgte über Nacht bei 37°C. Der Caseinabbau wurde anschließend bewertet. 0: kein Caseinabbau; -: sehr geringer Caseinabbau im Vergleich zum Wildtyp; + geringer Caseinabbau im Vergleich zum Wildtyp; +++ wildtypischer Caseinabbau.

Die Ergebnisse belegen die wichtige Rolle des Loop L2 und einzelner Aminosäuren dieser Domäne für den proteolytischen Abbau von Casein. Allerdings weisen die Mutanten DegP_{I228A} und DegP_{L229A}, anders als im pNA-Enzymtest (siehe 4.4.3.1), eine minimale Restaktivität auf.

4.4.3.3 Die Hydrolyse von β -Casein durch DegP L2-Mutanten

Als weiteres Modellsubstrat zur Analyse der proteolytischen Aktivität der L2-Mutanten wurde β -Casein eingesetzt (vergleiche 4.2.2.3.3). Bestätigend zu den Ergebnissen der Zymogramme (siehe 4.4.3.2) waren auch hier die Mutanten DegP_{I238A} und DegP_{F240A} proteolytisch inaktiv (siehe Tab. 4-15). Interessanterweise waren DegP_{I228A} und DegP_{I236A} hyperaktiv und bauten die eingesetzte Menge des β -Caseins drei bis sechsmal schneller ab als

das wildtypische DegP. Das Protein DegP_{L229A}, das im Zymogramm eine stark reduzierte Aktivität aufwies, zeigte beim Abbau von β -Casein eine dem Wildtyp vergleichbare Aktivität.

Tab. 4-15: Hydrolyse von β -Casein durch DegP L2-Mutanten

Dargestellt ist die Zeit bis zum vollständigen β -Casein-Abbau durch DegP und DegP Loop 2. Dazu wurde 1 μ M DegP mit 20 μ M β -Casein in 50 mM NaH₂PO₄, pH 8 bei 37°C inkubiert. Alle drei Minuten wurden 20 μ l entnommen und eine Acetonfällung durchgeführt. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Proteinnachweis mittels einer Coomassie-Blau Färbung.

Protein	Vollständiger β -Caseinverdau [min]
DegP	18
DegPI228A	3
DegPL229A	21
DegPI236A	6
DegPI238A	-
DegPF240A	-

4.4.3.4 Massenspektrometrische Untersuchung der Hydrolyse von Citratsynthase durch DegP L2-Mutanten

Um die Rolle einzelner Aminosäuren des Loop L2 für die prozessive Hydrolyse von Substraten zu untersuchen, wurden Citratsynthase-Komplettverdaus angefertigt und die entstandenen Fragmente mittels Massenspektrometrie⁵ identifiziert (vergleiche 4.2.2.3.4). Anschließend wurden die Fragmente mit die Ausgangssequenz der Citratsynthase abgestimmt. Traten verschiedene Fragmente mit demselben C-Terminus auf, so wurde das kürzeste Fragment für die weitere Auswertung verwendet. Aus den drei Punktmutanten mit proteolytischer Restaktivität wurden die beiden Proteine DegP_{I228A} und DegP_{I236A} gewählt und die Ergebnisse mit denen von DegP verglichen. Wie in Abb. 4-30 zu sehen, wich das Profil von DegP_{I236A} nicht wesentlich von dem des wildtypischen DegP ab. Auch hier war eine Präferenz für die hydrophoben Aminosäuren Alanin, Valin und Isoleucin an der Position -1 festzustellen. Dahingegen zeigte das Profil von DegP_{I228A} Abweichungen zu dem des Wildtyps (siehe Abb. 4-30). An der Position -1 wurden ebenfalls hydrophobe Aminosäuren präferiert, allerdings handelte es sich dabei um die Aminosäuren Leucin, Methionin und Valin. Dieses Ergebnis untermauert die wichtige Rolle der Aminosäure I228 als Bestandteil der S1 Bindetasche für die Substratspezifität von DegP. Um weitere Erkenntnisse in diesem Zusammenhang zu erlangen sollte I228 in andere Aminosäuren ausgetauscht werden und

⁵ Die massenspektrometrischen Analysen mittels Nano-LC-MS/MS wurden von Dr. René Zahedi, Department for Proteomics am ISAS Dortmund durchgeführt.

zusätzlich weitere Substrate in der massenspektrometrischen Untersuchung eingesetzt werden.

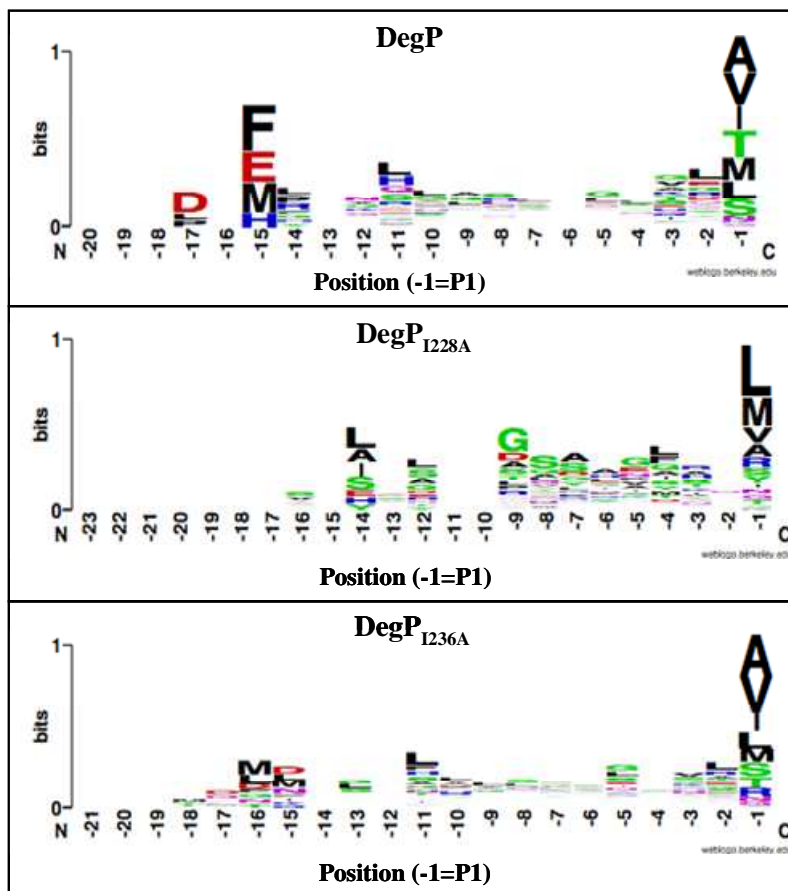


Abb. 4-30: Profil des Komplettverdaus von Citratsynthase durch DegP, DegP_{I228A} und DegP_{I236A}

Es wurde ein Komplettverdaus von Citratsynthase durch DegP, DegP_{I228A} und DegP_{I236A} durchgeführt und die entstandenen Fragmente mittels Massenspektrometrie identifiziert. Anschließend wurde auf www.weblogo.berkeley.edu ein Profil des Verdaus angefertigt, das hier dargestellt ist. Die Aminosäuresequenz der Fragmente wurde von der N-terminalen Aminosäure P₂₁ bzw. P₂₃ bis zur C-terminalen Aminosäure P₁ aufgetragen.

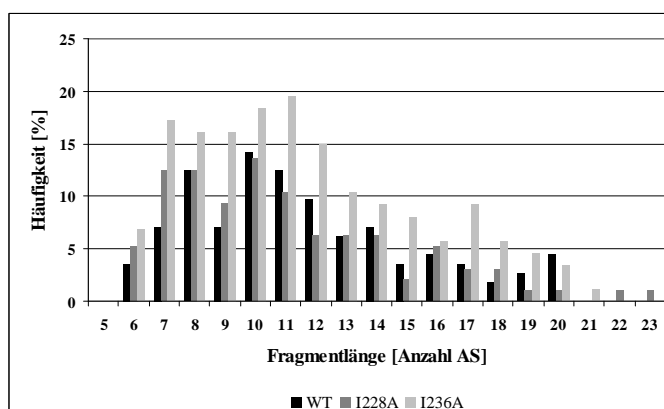


Abb. 4-31: Längen der Fragmente des Citratsynthase-Komplettverdaus durch DegP, DegP_{I228A} und DegP_{I236A}

Es wurde ein Komplettverdaus von Citratsynthase durch DegP, DegP_{I228A} und DegP_{I236A} durchgeführt und die entstandenen Fragmente mittels Massenspektrometrie identifiziert. Die Fragmentlängen wurden ausgezählt und deren Häufigkeit ermittelt. Die Mittelwerte ergaben 11,6 für DegP, 11,1 für DegP_{I228A} und 11,6 für DegP_{I236A}.

Die Auszählung der Fragmentlängen ergab bezüglich beider Mutanten keine signifikanten Abweichungen zu DegP. Die Mittelwerte der Fragmentlängen betrugen 11,6 (DegP), 11,1 (DegP_{I228A}) und 11,6 (DegP_{I236A}) (siehe Abb. 4-31). Auch die Verteilungen wichen nicht signifikant voneinander ab.

4.4.4 Aktivierung von DegP L2-Mutanten im pNA-Assay

Um aufzuklären, welche Rolle die einzelnen Aminosäuren des Loops L2 für die allosterische Aktivierung von DegP spielen, wurden die L2-Mutanten in pNA-Enzymtests mit verschiedenen Aktivatoren eingesetzt und die ermittelten Aktivierungsfaktoren zu denen des Wildtyps in Beziehung gesetzt (vergleiche 4.2.2.4). Die im pNA-Enzymtest aktiven L2-Mutanten DegP_{I228A} und DegP_{I236A} waren aktivierbar (siehe Tab. 4-16). Während die Zugabe des Peptids DNRDGNVYFF im pNA-Enzymtest mit dem Substrat SPMFKGV-pNA zu einer dem Wildtyp ähnlichen Aktivierung führte, resultierte die Inkubation mit β -Casein oder v β -Casein in einer im Vergleich zum Wildtyp verminderten Aktivierung. Im pNA-Enzymtest mit dem optimierten Substrat DPMFKLV-pNA und dem Aktivator v β -Casein waren interessanterweise erhöhte Aktivierungsfaktoren zu messen. Die in den pNA-Enzymtests inaktiven Mutanten DegP_{L229A}, DegP_{I238A}, und DegP_{F240A} ließen sich mit keinem der Aktivatoren aktivieren. Die Ergebnisse verdeutlichen die essentielle Rolle der Aminosäuren L229, I238 und F240 des Loop L2 für die allosterische Aktivierung von DegP. Die in den pNA-Enzymtests inaktiven Mutanten lassen sich erwartungsgemäß nicht aktivieren.

Tab. 4-16: Aktivierung der DegP L2-Mutanten im pNA-Enzymtest

Für den Enzymtest mit dem Substrat SPMFKGV-pNA wurden 1 μ M des zu testenden Proteins, für den Test mit dem Substrat DPMFKLV-pNA 0,1 μ M des zu testenden Proteins eingesetzt. Das Substrat wurde 0,5 mM eingesetzt. Von den Aktivatoren wurden folgende Konzentrationen/Mengen eingesetzt: mit 50 μ M DNRLGLVYFF; 3 μ M (entspricht 5 μ g) β -Casein; 5 μ g verdautes β -Casein (v β -Casein). Die zu testende Mutante wurde zur Bestimmung des Aktivierungsfaktors 5 min bei 37°C mit dem putativen Aktivator im Reaktionspuffer vorinkubiert (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0). Dann wurde das pNA-Substrat zugegeben und die Absorption für 1 h bei 37°C bestimmt. Aus den Werten ließ sich die spezifische Aktivität und somit der Aktivierungsfaktor errechnen. Dabei wurde auf die Proteinprobe ohne Aktivator normiert. -: keine Aktivierung. ^a 1 entspricht einer spezifischen Aktivität von 15 nmol x mg⁻¹ x min⁻¹ (SPMFKGV-pNA) bzw. 1400 nmol x mg⁻¹ x min⁻¹ (DPMFKLV-pNA). Die Standardabweichung lag unter 20%.

Mutante	x fache Aktivierung [Normiert] ^a			DPMFKLV-pNA + v β -Casein
	SPMFKGV-pNA + DNRDGNVYFF	β -Casein	v β -Casein	
DegP	2,5	10	15,9	2,4
DegPI228A	2,1	2,1	8,5	4,7
DegPL229A	-	-	-	-
DegPI236A	3,1	3,6	9,7	7,6
DegPI238A	-	-	-	-
DegPF240A	-	-	-	-

4.4.5 Oligomerisierung von DegP L2-Mutanten

Um die Rolle des Loop L2 für die Oligomerisierung von DegP zu ermitteln wurden die L2-Mutanten in Cross-Link Experimenten mit steigenden Konzentrationen des Aktivators DPMFKLV analysiert (vergleiche 4.2.2.5). Die Mutanten, die in vorangegangenen Experimenten als proteolytisch aktiv identifiziert wurden, wurden als proteolytisch inaktive Varianten (S210A) eingesetzt um durch Autoproteolyse auftretende Interferenzen zu vermeiden. DegP_{I228A,S210A} und DegP_{I236A,S210A} verhielten sich wie der Wildtyp und lagen in Abwesenheit des Aktivators hauptsächlich als Hexamer, Trimer und Monomer vor. Die Zugabe des Aktivators DPMFKLV induzierte schon bei einer eingesetzten Menge von 100 μ M einen nahezu kompletten Switch zum 12mer und 24mer (Daten nicht gezeigt). Abweichungen zum Wildtyp zeigten sich allerdings bei den getesteten Mutanten DegP_{L229A,S210A}, DegP_{I238A} und DegP_{F240A} (siehe Abb. 4-32).

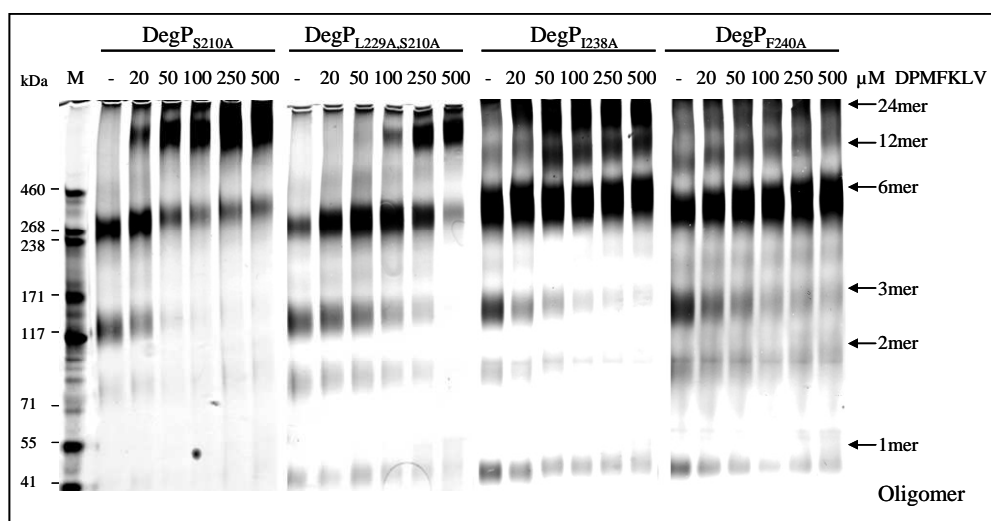


Abb. 4-32: Cross-Link von DegP L2-Mutanten in Anwesenheit des Peptids DPMFKLV

Die zu testenden Proteine wurden chemisch denaturiert und rückgefaltet. Anschließend wurden 0,6 μ M des Proteins mit verschiedenen Konzentrationen des Peptids DPMFKLV (gelöst in 100%DMSO) für 5 Minuten bei 37°C im Reaktionspuffer (500 mM NaH₂PO₄ pH 8,0) inkubiert. Der Cross-Linker Glutaraldehyd wurde in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) dazugegeben und die Reaktion wurde nach 2 min durch die Zugabe von Tris-HCl pH 7,5 (Endkonzentration 200 mM) gestoppt. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und etwa 133 ng/Spur auf ein Tris-Acetat-Gel (3-8%) aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde eine Silberfärbung durchgeführt.

Hier wurde die Umlagerung vom Hexamer zum 12mer und 24mer erst durch wesentlich höhere Konzentrationen des Aktivators erreicht. Während die Zugabe von 500 μ M DPMFKLV zu DegP_{L229A,S210A} dazu führte, dass ein Großteil des Proteins als 12mer und 24mer vorlag, lag bei den anderen beiden Proteinen bei der eingesetzten Aktivatorkonzentration von 500 μ M nur ein kleiner Teil des Proteins als 12mer und 24mer vor. Die Ergebnisse verdeutlichen die wichtige Rolle der Aminosäuren L229, I238 und F240

für die Aktivierung von DegP und die damit verbundene Umlagerung zu höheren Oligomeren und untermauern die in den Aktivitätstest gewonnenen Erkenntnisse.

4.4.6 Validierung der Bindung von Liganden an DegP L2-Mutanten mittels ITC

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass einzelne Aminosäuren des Loop L2 eine wichtige Rolle für die Aktivierung und die Oligomerisierung von DegP spielen. Um zu untersuchen, ob der Defekt in der Aktivierbarkeit von DegP_{L229A}, DegP_{L238A} und DegP_{F240A} an der fehlenden Bindung der Aktivatoren β -Casein und DPMFKLV an die Mutanten liegt, wurden Bindungsstudien mittels ITC durchgeführt (vergleiche 4.2.2.6). Da DegP_{L229A} proteolytisch aktiv ist, wurde die proteolytisch inaktive Variante eingesetzt. Tab. 4-17 zeigt die ermittelten Bindekonstanten. Die Bindekonstanten zwischen β -Casein und den untersuchten L2-Mutanten lagen zwischen 1,52 und 4,19 μ M und lagen somit nahe an der K_d zu DegP_{S210A} (3,75 μ M). Die Werte zeigen, dass die fehlende Aktivierbarkeit dieser Mutanten durch β -Casein nicht an der fehlenden Bindung liegt, da β -Casein weiterhin stark an die Proteine bindet. Dieses Ergebnis bestätigt die Rolle des Loop L2 und der einzelnen Aminosäuren dieses Loops als wichtige Bestandteile der Aktivierungsdomäne von DegP. Die Bindekonstanten zwischen den untersuchten L2-Mutanten und dem Peptid DPMFKLV lagen zwischen den Werten 42,92 und 48,54 μ M. Im Vergleich zu der Bindung zu DegP_{S210A} handelt es sich somit um eine eher schwache Bindung. Die Daten lassen vermuten, dass der spezifische Aktivator primär an die PDZ1-Domäne bindet, aber auch Wechselwirkungen mit dem Loop L2 eingeht. Dabei ist die Bindung an die PDZ1-Domäne Voraussetzung für die sekundäre Wechselwirkung mit Loop L2, was bedeuten kann, dass die PDZ1-Domäne den Liganden in die notwendige Position bringt. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass Kontakte zwischen dem Loop L2 und der PDZ1-Domäne notwendig sind um eine stabile Bindung zu gewährleisten.

Tab. 4-17: Bindungsaffinitäten zwischen β -Casein und DegP L2-Mutanten

Die Bestimmung der Bindekonstanten von β -Casein bzw. DPMFKLV an DegP Loop 2-Mutanten wurde mittels ITC bei 37°C durchgeführt. Dazu wurden Ligand und Proteine in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8 gelöst. Während die DegP-Mutanten 20 μ M eingesetzt wurden, variierte die Konzentration von β -Casein je nach Stärke der Bindung. Die Daten wurden nach dem Modell einer Bindestelle gefittet und die ermittelten Bindekonstanten (K_d) sind in der Tabelle dargestellt.

Mutante	Ligand	K_d [μ M]
DegP _{S210A}	β -Casein	3,75
DegP _{L229A,S210A}	β -Casein	4,19
DegP _{L238S}	β -Casein	1,52
DegP _{F240A}	β -Casein	2,83
DegP _{S210A}	DPMFKLV	4,98
DegP _{L229A,S210A}	DPMFKLV	48,54
DegP _{L238A}	DPMFKLV	48,11
DegP _{F240A}	DPMFKLV	42,92

5 Diskussion

5.1 Neue Einblicke in den Mechanismus der DegP-Aktivierung und Oligomerisierung

Die HtrA-Protease DegP spielt eine zentrale Rolle in der bakteriellen Proteinqualitätskontrolle und zeichnet sich durch ihre Doppelfunktion als Protease und Chaperon aus (Spiess *et al.*, 1999). Während lange Zeit nur die temperaturabhängige Aktivierung der Protease bekannt war, deckten neuere Studien auf, dass DegP einem allosterischen Aktivierungsmechanismus unterliegt (Krojer *et al.*, 2008a; Krojer *et al.*, 2008b; Meltzer *et al.*, 2008; Meltzer, 2008). Es wurde gezeigt, dass dieser Mechanismus über die temperaturabhängige Aktivierung dominiert und durch eine vorherige Peptidbindung initiiert werden kann.

Allosterie, wie sie für DegP bestimmt wurde, ist bei Proteinen weit verbreitet. Beispiele für allosterisch regulierte Proteine sind Hämoglobin (Perutz, 1970; Perutz, 1972; Perutz *et al.*, 1998; Eaton *et al.*, 1999) und GroEL (Yifrach und Horovitz, 1995). Das erste Model zur Allosterie, das MWC Model, wurde bereits 1965 von Monod, Wyman und Changeux aufgestellt (Monod *et al.*, 1965). Kernaussage dieser Theorie war, dass Proteine in zwei unterschiedlichen, sich im Gleichgewicht befindenden, Zuständen vorliegen. Dabei kann zwischen einer starren, ungebundenen (T-Struktur) und einer flexiblen, substratgebundenen (R-Struktur) Struktur unterschieden werden. Die Bindung eines Effektors an eine vom aktiven Zentrum entfernte Untereinheit verschiebt das Gleichgewicht in Richtung R-Struktur. Die spätere Erweiterung des Models um die Kooperativität resultierte in dem Koshland-Némethy-Filmer (KNF) Model, das das bereits 1935 aufgestellte Model für die intramolekulare Kontrolle des Hämoglobins von Pauling aufgriff (Pauling, 1935; Koshland *et al.*, 1966). Auch bei Serinproteasen wurde der Mechanismus der allosterischen Aktivierung bereits früh identifiziert. Für Trypsin, eine Serinprotease der Familie S1A, wurde gezeigt, dass das Zymogen aus vier deformierten, flexiblen Segmenten besteht. Die distinkte Proteolyse des Zymogens führt zu einer Umorientierung des Enzyms, die in einer geordneten Konformation resultiert (Huber und Bode, 1978; Page *et al.*, 2008). Dabei ist das Ausbilden des funktionellen proteolytischen Zentrums gekoppelt mit der Bindung des geschnittenen N-Terminus der reifen Protease. Im Jahr 1976 beschrieben Bode und Huber erstmals die allosterische Aktivierung von Trypsin durch ein Dipeptid, das dem aktivierenden N-Terminus entspricht (Bode und Huber, 1976).

Ein alternativer allosterischer Regulationsmechanismus wurde für die HtrA-Protease DegS gezeigt, die ein Homolog von DegP ist. Der membrangebundene Stresssensor der

periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle ist unter stressfreien Bedingungen inaktiv. Erst die Bindung von Aktivatorpeptiden mit der C-terminalen Konsensussequenz der Außenmembranproteine an die PDZ-Domäne von DegS führt zu einer Umorientierung in die aktive Konformation (Walsh *et al.*, 2003; Wilken *et al.*, 2004; Sohn *et al.*, 2007; Cezairliyan und Sauer, 2007; Hasselblatt *et al.*, 2007). Bindungsstudien belegen, dass Peptide mit dem C-Terminus -YXF über die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin an die PDZ-Domäne und über die Aminosäure an Position -1 an Loop L3 der Proteasedomäne binden. Dabei ist sowohl die Aktivierungs- als auch die Bindungsstärke abhängig von der vorletzten Aminosäure (Wilken *et al.*, 2007).

Für DegP wurde eine ähnliche Regulation postuliert. Es wurden Peptide mit der Sequenz DNRDGNVYXF synthetisiert und die Aminosäure an Position -1 variiert (Meltzer, 2008). In quantifizierbaren Enzymtests wurde gezeigt, dass der Grad der Aktivierung abhängig ist von der vorletzten Aminosäure des Aktivatorpeptids. Enzymtests mit weiteren putativen Aktivatorpeptiden ließen allerdings vermuten, dass auch Aminosäuren an anderen Positionen eine wesentliche Rolle für die Aktivierung von DegP spielen. Oligomerisierungsanalysen deuteten im Weiteren darauf hin, dass die DegP-Aktivierung einhergeht mit einer Veränderung des oligomeren Zustandes. Dabei führte die Inkubation mit Aktivatoren zu einer Umlagerung vom hexameren Ruhezustand zum enzymatisch aktiven 12mer und 24mer (Meltzer, 2008).

Die Identifizierung und Charakterisierung neuer Aktivatoren sowie die Identifizierung von DegP-Bereichen, die an der Regulation von DegP beteiligt sind, trugen in der vorliegenden Arbeit zu der mechanistischen Aufklärung der DegP-Aktivierung und Oligomerisierung bei.

5.1.1 Die Stärke der DegP-Aktivierung korreliert mit der Stärke der Bindung des Aktivators an DegP

Die in dieser Arbeit durchgeführten Aktivitätstests und Bindungsstudien untermauern die postulierte Hypothese, dass DegP über die Bindung von Peptiden allosterisch aktiviert wird. Im Weiteren weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Stärke der DegP-Aktivierung mit der Stärke der Bindung verschiedener Aktivatoren an DegP korreliert (siehe 4.1.3). Während keine signifikante Bindung zwischen dem schwachen Aktivator DNRDGNVYSF sowie dem nicht aktivierenden Peptid SPMFKGV und DegP detektiert wurde, lagen die Dissoziationskonstanten der übrigen, stärker aktivierenden, getesteten Peptide zwischen 4,98 μM und 32,68 μM . Stärkere Aktivatoren zeigten dabei höhere Affinitäten zu DegP_{S210A} als schwache Aktivatoren. Eine Ausnahme stellte der schwache Aktivator DNRDGNVYWF

dar, der mit einer K_d von 7,75 μM sehr stark an DegP gebunden hatte. Der Vergleich mit dem Peptid DNRDGNVYFF, das DegP 4,5-fach aktiviert und mit einer K_d von 16,37 μM an DegP_{S210A} bindet, lässt vermuten, dass die Aminosäure Tryptophan an Position -1 positiv zur Bindung des Peptids an DegP beiträgt, aber die Übertragung des Aktivierungssignals behindert.

Die in dieser Arbeit ermittelten Dissoziationskonstanten zwischen Aktivatorpeptiden und DegP_{S210A} liegen im gewöhnlich messbaren Bereich für Protein-Ligand-Interaktionen. Während die K_d s zwischen Transkriptionsfaktoren und DNA meist im nanomolaren Bereich liegen (Maerkl und Quake, 2007), weisen viele Enzym-Substrat-Reaktionen Dissoziationskonstanten im mikromolaren bis millimolaren Bereich auf (Fersht, 1999). Dabei sind Bindungen von Protein-Ligand-Interaktionen in Systemen, bei denen es einer schnellen Reaktion auf Veränderungen der Umwelt bedarf, meist schwächer (mikromolar bis millimolar), um eine schnelle Dissoziation des gebildeten Komplex zu gewährleisten. Die Dissoziationskonstanten von PDZ-Proteinen und den C-Termini ihrer Liganden variieren stark und liegen meist im niedrigen mikromolaren Bereich. Saro *et al.* untersuchten in diesem Zusammenhang die Bindung von linearen Peptiden an die gut untersuchte PDZ3-Domäne von PSD95 mittels ITC (Saro *et al.*, 2007). Als Peptide wurden C-terminale Sequenzen von an PDZ3-bindenden Proteinen wie CRIPT und Neuroligin-1 gewählt. Es wurden Dissoziationskonstanten zwischen 0,47 μM und 152 μM ermittelt. Stärkere Bindungsaffinitäten konnten mittels ITC zwischen den beiden PDZ-Domänen von Syntenin und ausgewählten Peptiden ermittelt werden. Die stärkste Bindung wurde in diesem Zusammenhang mit einer K_d von 200 nM zu einem Peptid bestimmt, dass von dem C-Terminus des an Syntenin bindenden Proteins Merlin abstammt (Kang *et al.*, 2003).

Die in dieser Arbeit getesteten Aktivatoren binden im niedrigen mikromolaren Bereich an DegP_{S210A}, was eine zügige Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen ermöglicht und im typischen Bereich für PDZ-Peptid Interaktionen liegt. Für das DegP-Homolog DegS und seine Liganden wurden ebenfalls Dissoziationskonstanten im mittleren mikromolaren Bereich bestimmt (Wilken, 2006; Wilken *et al.*, 2007).

Auch die Bindung des Substrats β -Casein an DegP wurde in dieser Arbeit untersucht. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass β -Casein von DegP hydrolysiert wird und die enzymatische Reaktion positiv autoreguliert wird. Dabei aktivieren sowohl das intakte β -Casein als auch die entstehenden Proteolysefragmente DegP allosterisch (Spiess *et al.*, 1999; Meltzer *et al.*, 2008; Meltzer, 2008). In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass β -Casein

gleichzeitig DegP-Substrat und Aktivator darstellt und mit einer Dissoziationskonstante von 3,75 μM relativ stark an DegP_{S210A} bindet.

5.1.2 Der Mechanismus der Oligomerisierung von DegP

Die Arbeiten von Meltzer sowie Krojer *et al.* haben gezeigt, dass die DegP-Aktivierung mit der Ausbildung höherer Oligomere einhergeht (Meltzer *et al.*, 2008; Meltzer, 2008; Krojer *et al.*, 2008a). Um diesen Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit genauer zu untersuchen, wurden Cross-Link Analysen in Anwesenheit verschiedener Aktivatoren durchgeführt (siehe 4.1.4). Da DegP temperaturreguliert ist (Spiess *et al.*, 1999), wurde außerdem der Effekt der Temperatur auf den oligomeren Zustand von DegP untersucht.

Die Analysen ergaben, dass die Rückfaltung von chemisch denaturiertem DegP in Abwesenheit von Aktivatoren bei allen getesteten Temperaturen zu der Ausbildung von Monomeren, Dimeren, Trimeren und Hexameren führt. Die Zugabe von Aktivatoren führte zu der Umlagerung vom Hexamer zum 12mer und 24mer sowie zu einer vermehrten Ausbildung des Hexamers und einem gleichzeitigen Rückgang kleinerer Oligomere (siehe 4.1.4). Diese Ergebnisse geben Hinweise auf eine sequenzielle Konversion von DegP-Monomeren zu Dimeren und Trimeren. Die trimeren Partikel bilden, wie bereits in der Kristallstruktur des Hexamers gezeigt, den funktionellen Baustein von DegP und lagern sich zum Hexamer zusammen (Krojer *et al.*, 2002). Die Bindung der Aktivatoren initiiert mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ausbildung der aktiven höheren Oligomere (12mer / 24mer). Bisher wurde nicht eindeutig geklärt, ob sich die höheren Oligomere (12mer / 24mer) direkt aus Hexameren oder aus Trimeren bilden. Die Kristallstruktur des 24mers lässt vermuten, dass hexamere Partikel zu Trimeren zerfallen und diese dann zu höheren Oligomeren assemblieren, da das 24mer aus acht zusammen gelagerten Trimeren aufgebaut ist (Krojer *et al.*, 2008a).

Neben den hier erläuterten Ergebnissen zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Cross-Link Experimente außerdem, dass der initiale Faltungsprozess und die Konversion in höhere oligomere Zustände unter aktivierenden Bedingungen sehr schnell, robust und stark beschleunigt bei höheren Temperaturen stattfindet. Diese Eigenschaften erlauben DegP die Funktion als Hitzeschockprotein, das eine wichtige Rolle in der Proteinqualitätskontrolle der Zelle einnimmt.

Die Aktivierung über die Veränderung des oligomeren Zustandes ist ein bekannter Mechanismus vieler Proteinfamilien. Das aktive Zentrum wird dabei meist durch mehrere Untereinheiten gebildet und die Ausbildung eines intakten aktiven Zentrums durch die

Oligomerisierung kontrolliert. Ein Beispiel für ein durch Oligomerisierung reguliertes Enzym ist die Rezeptortyrosinkinase, die erst durch die Ligand-induzierte Dimerisierung aktiviert wird (Sheth *et al.*, 2008). Weitere Beispiele stellen die Hsp100/Clp Proteine dar, die in der bakteriellen Proteinqualitätskontrolle des Cytosols involviert sind. Es handelt sich um ATPasen der AAA+ Proteinfamilie, die meist mit oligomeren Peptidasen assoziieren, um ihre Funktion als ATP-abhängige Proteasen einzunehmen. Einigen Mitgliedern dieser Familie wurde außerdem eine zusätzliche Chaperonaktivität nachgewiesen (Weber-Ban *et al.*, 1999; Wickner *et al.*, 1994; Burton *et al.*, 2001). Vorausgegangene Studien zeigen eine Korrelation zwischen der ATPase-Aktivität, der Chaperonaktivität und der Oligomerisierung dieser Proteine. Während sie im inaktiven Zustand als Monomere vorliegen, lagern sich diese im aktiven Zustand zu ringförmigen höheren Oligomeren zusammen (Schirmer *et al.*, 1996; Horwich *et al.*, 1999; Neuwald *et al.*, 1999). Die Korrelation zwischen Aktivität und Oligomerisierung wurde in diesem Zusammenhang bereits für einige Mitglieder wie ClpC, ClpA, ClpB, HslVU und Hsp104 postuliert (Singh und Maurizi, 1994; Hattendorf und Lindquist, 2002; Seong *et al.*, 2002; Mogk *et al.*, 2003; Kirstein *et al.*, 2006). Für ClpC, ein bakterielles Hitzeschockprotein, wurde im Besonderen gezeigt, dass die Umlagerung zum Hexamer in Anwesenheit von Nukleotiden durch das Adaptorprotein MecA initiiert wird (Schlothauer *et al.*, 2003; Kirstein *et al.*, 2006).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten auf eine zu ClpC vergleichbare Aktivierung von DegP hin. Es findet ebenfalls eine Aktivierung über die Veränderung des oligomeren Zustandes statt, die durch die Bindung von Substraten ausgelöst wird. Im Unterschied zu DegP wird die Bindung des Liganden an ClpC allerdings nicht über eine PDZ-Domäne vermittelt. Ein weiterer Unterschied zwischen ClpC und DegP besteht darin, dass das aktive Zentrum von DegP nicht erst durch die Zusammenlagerung mehrerer Untereinheiten gebildet wird. Wie durch die Aufklärung der Kristallstrukturen des Hexamers und des 24mers gezeigt wurde, führt die Aktivierung von DegP zu einer strukturellen Umorientierung der Proteasedomäne, so dass jedes Monomer im aktiven Zustand ein funktionsfähiges strukturiertes aktives Zentrum besitzt (Krojer *et al.*, 2002; Krojer *et al.*, 2008a).

5.2 Die Bindeeigenschaften von DegP

5.2.1 Die Sequenzspezifität der PDZ1-Domäne

Zahlreiche Studien geben Hinweise darauf, dass die PDZ1-Domäne von DegP eine wichtige Rolle in der Bindung der Substrate und Aktivatoren einnimmt (Spiess *et al.*, 1999; Sassoon *et al.*, 1999; Clausen *et al.*, 2002; Iwanczyk *et al.*, 2007; Krojer *et al.*, 2008b). Zur Aufklärung der Sequenzspezifität dieser Domäne sollte die Untersuchung einer Peptidbibliothek beitragen, die 649 C-terminale Sequenzen von *E. coli* Zellhüllproteinen enthielt (siehe 4.1.5). Es wurde eine deutliche Präferenz für hydrophobe Aminosäuren (L/A/V/I) sowie für die aromatische Aminosäure Phenylalanin an der Position 0 des DegP-Liganden festgestellt. Diese Ergebnisse decken sich mit Daten anderer Studien, in denen ebenfalls eine Präferenz für hydrophobe Aminosäuren an Position 0 benannt wurde (Krojer *et al.*, 2008b; Hauske *et al.*, 2009).

Auch für andere PDZ-Proteine wie GRIP (glutamate receptor interacting protein), PSD-95 und das dendritische Protein Homer, die unterschiedlichste Substrate binden, wurde eine einheitliche Präferenz für hydrophobe Aminosäuren, insbesondere Valin, Isoleucin und Leucin, an Position 0 nachgewiesen (Doyle *et al.*, 1996; Brakeman *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 1997). Diese Präferenz lässt sich auf die konservierte hydrophobe Bindetasche der PDZ-Domänen zurückführen.

Insgesamt ergab sich in dieser Arbeit mit dem Bindemotiv -x-(Y/E/L)-(L/R/T)-(F/L/A/V/I)-COOH eine eher niedrige Sequenzspezifität der PDZ1-Domäne. Die Ergebnisse deuten daher auf eine eher plastische Substratbindetasche der PDZ1-Domäne hin, die Substrate mit stark voneinander abweichenden C-Termini bindet und so die *Housecleaningfunktion* von DegP ermöglicht (Spiess *et al.*, 1999).

Eine ähnlich niedrige Substratspezifität wurde mit dem Bindemotiv -x-(F/I/L/V)-(F/I/L/W/Y)-(A/I/L/V) für das humane DegP-Homolog HtrA1 bestimmt (Wolter, 2009).

5.2.2 Die Sequenzspezifität des aktiven Zentrums

Auch die Sequenzspezifität des aktiven Zentrums von DegP wurde in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht. Um diese abzuleiten, wurden Komplettverdaus der Citratsynthase durch DegP durchgeführt und massenspektrometrisch analysiert. In diesem Zusammenhang wurde eine Präferenz für die hydrophoben Aminosäuren Alanin, Valin und Isoleucin an der Position P₁ detektiert (siehe 4.2.2.3.4). Dieses Ergebnis deckt sich mit Daten aus anderen Studien, die

ebenfalls eine Spezifität für kleine hydrophobe Aminosäuren an dieser Position postulieren (Kolmar *et al.*, 1996; Meltzer, 2008).

Die Spezifität für die Position P_1 des Substrats wird bei Proteasen durch die $S1$ Bindetasche bestimmt. So wurde für die Serinprotease Trypsin eine Präferenz für die Aminosäuren Arginin oder Lysin an Position P_1 postuliert, die auf negativ geladene Aminosäuren der $S1$ Bindetasche zurückzuführen ist (Huber *et al.*, 1974). Dahingegen zeigt die Serinprotease Elastase eine Präferenz für eher kleine aliphatische Aminosäurereste, die auf eine sehr kleine $S1$ Bindetasche beruht (Shotton und Watson, 1970).

Die hydrophobe Substratbindetasche von DegP wird moduliert durch den Loop L1 und den N-Terminus des Loop L2. Der Austausch der Aminosäure Isoleucin an Position 228, die zu dem N-terminalen Bereich des Loop L2 gehört, führte daher erwartungsgemäß zu einer veränderten Spezifität an Position P_1 (siehe 4.4.3.4). Da Isoleucin in diesem Fall gegen die ebenfalls hydrophobe Aminosäure Alanin ausgetauscht wurde, wurden weiterhin hydrophobe Aminosäuren an dieser Position (Leucin, Methionin, Valin) präferiert.

Für die Positionen P_2 - P_{14} wurde in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Sequenzspezifität detektiert. Auch für die Aminosäuren auf der P' - Seite wurde bisher keine eindeutige Präferenz für bestimmte Aminosäuren bestimmt.

5.2.3 Das Aktive Zentrum und die PDZ1-Domäne von DegP besitzen eine ähnliche Sequenzspezifität

Die in 5.2.1 und 5.2.2 diskutierten Ergebnisse deuten zusammengefasst darauf hin, dass die PDZ1-Domäne und das aktive Zentrum von DegP ähnliche Sequenzspezifitäten aufweisen. Diese Daten untermauern das von Krojer *et al.* aufgestellte Modell der Prozessivität, das besagt, dass Substrate prozessiv von DegP hydrolysiert werden, in dem PDZ1- und Proteasedomäne miteinander kooperieren (Krojer *et al.*, 2008b). Dabei bindet die PDZ1-Domäne eines Monomers den C-Terminus des Substrates und fixiert es für die Hydrolyse durch die Proteasedomäne. Der Schnitt erzeugt einen neuen C-Terminus, der wiederum von der PDZ1-Domäne eines nahe liegenden Monomers gebunden wird, so dass eine erneute Hydrolyse durch die Proteasedomäne stattfinden kann. Dieser Prozess bedarf ähnlicher Sequenzspezifitäten der beteiligten Domänen. Da sich das Substrat während des Prozesses bereits innerhalb des DegP-Partikels befindet, ist eine hohe Affinität der einzelnen Domänen zu dem vorliegenden Substrat aufgrund der hohen lokalen Konzentration vermutlich nicht erforderlich.

Auch die in dieser Arbeit definierten Fragmentlängen der Proteolyseprodukte des Citratsynthaseverdau durch DegP, die zwischen 6 und 20 Aminosäuren lagen, untermauern das Modell der Prozessivität. Die definierten Längen resultieren vermutlich aus der Distanz zwischen PDZ1-Domäne und aktivem Zentrum, wobei die Flexibilität der PDZ1-Domäne wahrscheinlich zu der hier beobachteten Varianz führt (Krojer *et al.*, 2002). Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass sich die Varianz der Fragmentlängen dadurch ergibt, dass sowohl PDZ1- und Proteasedomänen eines Monomers, als auch benachbarter Monomere miteinander interagieren können und sich so unterschiedliche Entfernungen und somit Fragmentlängen ergeben.

Einen ähnlichen Prozess der Proteolyse zeigten Beebe *et al.* für die bakterielle Protease Tsp (Beebe *et al.*, 2000). Es wurde postuliert, dass Tsp eine interne PDZ-Domäne besitzt, die Substrate bindet und sie für die Proteolyse fixiert. Die Substrate werden dabei durch eine 11 Aminosäuren lange SsrA Signalsequenz markiert und in einem definierten Bereich protolysiert.

Das Modell der prozessiven Hydrolyse und die in der vorliegenden Arbeit erzielten Erkenntnisse tragen im Weiteren zu der Beantwortung der Frage bei, wie DegP zwischen degradierbaren und reparierbaren Substraten unterscheidet. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass DegP un- und fehlgefaltete Proteine degradiert, während es korrekt gefaltete Moleküle wie OmpC-Monomere im Inneren des 24mers vor dem proteolytischen Abbau schützt und reparierbare Proteine in der Rückfaltung unterstützt (Spiess *et al.*, 1999; Misra *et al.*, 2000; CastilloKeller und Misra, 2003; Krojer *et al.*, 2008a; Shen *et al.*, 2009). Die prozessive Hydrolyse von DegP-Substraten, an der zwei distanzierte Domänen beteiligt sind, ermöglicht ausschließlich die Proteolyse von ungefalteten Substraten, deren C-Termini mit beiden Domänen in Kontakt treten können. DegP-Substrate bestimmen daher ihr eigenes Schicksal über ihren Faltungszustand mit.

Die hier beschriebene komplexe Regulation unterscheidet DegP von klassischen Serinproteasen wie Trypsin oder Chymotrypsin, die allosterisch aktiviert werden und Substrate eher unabhängig von deren Faltungszustand sequenzspezifisch hydrolysieren (Hedstrom, 2002).

5.3 Identifizierung neuer DegP-Aktivatoren

In dieser Arbeit wurden neue spezifische DegP-Aktivatoren identifiziert (siehe 4.1.2; 4.1.5). Unter anderem handelte es sich dabei um das Peptid DPMFKLV, das im Verlauf der Arbeit bereits erfolgreich für die Aufklärung des Aktivierungsmechanismus eingesetzt wurde, sowie

um die Peptide CHHSAFPVFL und DYFGSALLRV, die die C-Termini zweier *E. coli* Zellhüllproteine darstellen. Die Betrachtung dieser Aktivatoren verdeutlicht, dass die Bindetasche der PDZ1-Domäne sehr plastisch ist und Peptide mit sehr unterschiedlichen Sequenzen an diese Domäne binden können. Die Aufstellung aller in dieser Arbeit untersuchten Peptide verdeutlicht diesen Sachverhalt zusätzlich (siehe Tab. 5-1).

Alle in dieser Arbeit identifizierten Aktivatoren besaßen, entsprechend der in 5.2.1 diskutierten Ergebnisse, die aliphatischen hydrophoben Aminosäuren Valin oder Leucin oder die aromatische Aminosäure Phenylalanin an Position 0. Der Vergleich der beiden Peptide DPMFKLV und SPMFKGV zeigte zusätzlich, dass die Aminosäure an Position -1 und eventuell auch die Aminosäure an Position -6 ebenfalls eine wichtige Rolle für die Bindung an die PDZ1-Domäne und somit für die Aktivierung von DegP spielt. Insgesamt besaßen starke DegP Aktivatoren vermehrt hydrophobe Aminosäuren an den Positionen 0 bis -5. Auffällig war, dass der Aktivator RVKKGEFELL mit einer K_d von 75,76 μM sehr schwach an DegP_{S210A} gebunden hatte. Der Vergleich mit den Aminosäuresequenzen der anderen Aktivatoren lässt die Vermutung aufkommen, dass die negativ geladene Aminosäure Glutamat an den Positionen -2 und -4 die Bindung des Aktivators wesentlich schwächt. Auch die Aminosäuren Lysin an Position -6, Valin an Position -8 oder Arginin an Position -9 könnten für die Schwächung der Bindung verantwortlich sein.

Tab. 5-1: DegP-Aktivatoren

Dargestellt sind die in dieser Arbeit untersuchten Peptide und die in der ITC zu DegP_{S210A} ermittelten Dissoziationskonstanten sowie die in pNA-Enzymtests ermittelten Aktivierungsfaktoren. Aminosäuren sind je nach Eigenschaft ihres Rests farbig hinterlegt: grün: negativ geladen; blau: polar, hydrophil; orange: hydrophob; gelb: positiv geladen. ^a 1 entspricht einer spezifischen Aktivität von 15 nmol x mg⁻¹ x min⁻¹.

Aminosäuresequenz										Kd [μM]	x-fache Aktivierung [Normiert] ^a
-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0		
D	Y	F	G	S	A	L	L	R	V	4,61	14,5
C	H	H	S	A	F	P	V	F	L	8,31	10,2
-	-	-	D	P	M	F	K	L	V	4,98	8,0
D	N	R	D	G	N	V	Y	F	F	16,37	4,5
E	Y	T	L	S	G	S	Y	T	F	8,47	2,0
R	V	K	K	G	E	F	E	L	L	75,76	2,0
D	N	R	D	G	N	V	Y	W	F	7,75	1,95
D	N	R	D	G	N	V	Y	L	F	32,68	1,6
D	N	R	D	G	N	V	Y	Q	F	25,64	1,5
D	N	R	D	G	N	V	Y	S	F	-	1,4
-	-	-	S	P	M	F	K	G	V	-	1,0

Die Identifizierung und Charakterisierung weiterer DegP-Aktivatoren ist notwendig um weitere Einblicke in die Sequenzspezifität der PDZ1-Domäne zu erhalten. Dazu können weitere Peptide, bei denen ein positives Signal im Screening der Peptidbibliothek gemessen wurde, in Aktivitätstests, Bindungsstudien und Cross-Link Analysen getestet werden. Potentielle Kandidaten sind zum Beispiel die C-Termini der Proteine TrkA, AroM, YjfN und PgaA (siehe Tab. 7-1).

5.4 Die Rolle verschiedener DegP-Bereiche für die Aktivierung und Oligomerisierung

5.4.1 Die PDZ1-Domäne ist von zentraler Bedeutung für die Funktion von DegP

Zahlreiche Studien sprechen der PDZ1-Domäne eine wesentliche Rolle für die Substrat- und Aktivatorbindung von DegP zu (Spiess *et al.*, 1999; Sassoon *et al.*, 1999; Clausen *et al.*, 2002; Iwanczyk *et al.*, 2007; Krojer *et al.*, 2008b).

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse untermauern die postulierte Rolle der PDZ1-Domäne und verdeutlichen, dass diese Domäne von zentraler Bedeutung ist für die Funktion von DegP (siehe 4.2). Dabei scheint sie eine wichtige Rolle für die proteolytische Aktivität und die allosterische Aktivierung zu spielen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sie ebenfalls eine bedeutsame Funktion für die Oligomerisierung der Protease einnimmt. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Punktmutationen in der PDZ1-Domäne zu einer stark eingeschränkten proteolytischen Aktivität führen können. Die Analyse der proteolytisch aktiven Punktmutanten DegP_{R262A} und DegP_{V328S} zeigte außerdem, dass diese nicht mehr aktivierbar waren. In Oligomerisierungsanalysen wurde des Weiteren gezeigt, dass bestimmte PDZ1-Punktmutanten ausschließlich als Monomere, Dimere, Trimere und Hexamere vorlagen und unter aktivierenden Bedingungen nicht zum 12mer oder 24mer assemblierten. In weiterführenden Bindungsstudien mittels ITC wurde außerdem gezeigt, dass Aktivatorpeptide spezifisch an die PDZ1-Domäne binden, da alle in dieser Arbeit untersuchten Punktmutanten keine signifikante Bindung zu den Aktivatorpeptiden DNRDGNVYFF und DPMFKLV zeigten.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die PDZ1-Domäne DegP Substrate bindet und diese für den Abbau durch die Protease fixiert. Substrate scheinen dabei gleichzeitig als Aktivatoren zu dienen, die die Bildung der höheren aktiven Oligomere initiieren. Die Kombination der PDZ1-Domäne mit der Proteasedomäne ermöglicht somit die hier beschriebene, sehr komplexe Regulation und Funktion von DegP.

Auch für andere Proteasen wurde eine ähnlich komplexe Regulation über die Kombination von Protease- und PDZ-Domänen beschrieben. Neben der in 5.2.3 bereits erwähnten Protease Tsp kann in diesem Zusammenhang ebenfalls die RIP-Protease RseP erwähnt werden. RseP ist ein Regulator in der σ^E -Signalkaskade und besitzt eine periplasmatische PDZ-Domäne, für die eine regulierende Funktion vermutet wird. Bohn *et al.* zeigten in diesem Zusammenhang, dass die PDZ-Domäne RseP in seiner Proteaseaktivität inhibiert (Bohn *et al.*, 2004). Inaba *et al.* postulierten kürzlich, dass RseP zwei PDZ-Domänen besitzt (PDZ-N und PDZ-C), wobei die proteolytische Funktion von RseP über die Ligandbindung an die PDZ-N reguliert wird (Inaba *et al.*, 2008).

Eine inhibierende Rolle für die proteolytische Aktivität konnte ebenfalls für die PDZ-Domäne des DegP-Homologs DegS gezeigt werden (siehe 5.6).

5.4.2 Die Rolle des Loop L3 für die Funktion von DegP

Zur weiteren Aufklärung des Aktivierungsmechanismus von DegP wurden ebenfalls Elemente der Proteasedomäne genauer charakterisiert. Ein Fokus wurde dabei auf den Loop L3 gerichtet, da vermutet wird, dass dieser Loop die Kommunikation zwischen Proteasedomäne und PDZ-Domänen vermittelt. Sowohl die Struktur und Lage des Loops im DegP 24mer als auch die konservierte regulatorische Funktion dieses Loops in anderen HtrA-Proteasen geben Hinweise darauf (siehe Abb. 5-1) (Wilken *et al.*, 2004; Hasselblatt *et al.*, 2007; Krojer *et al.*, 2008a; Meltzer *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern diese Hypothese und verdeutlichen die wichtige Rolle des Loop L3 für die proteolytische Aktivität, die Aktivierung und die Oligomerisierung von DegP (siehe 4.3). Für den stabilen Stamm des Loops wurde eine besonders wichtige Rolle verdeutlicht, da bestimmte Punktmutationen in dieser Region (R187A, E196A, F198A) zu einem nahezu vollständigen Funktionsverlust der Protease führten. Die Mutanten ließen sich nicht über DegP-Liganden aktivieren und assemblierten nur sehr eingeschränkt zu höheren Oligomeren (12mer / 24mer). Auch die Deletion der Aminosäuren 189-195, die den flexiblen Loop des Loop L3 bilden, führte zu einem vollständigen Verlust der proteolytischen Aktivität, zu einer fehlenden Aktivierbarkeit und einem Defekt in der Ausbildung höherer aktiver Oligomere. Einzelne Aminosäureaustausche in dieser Region resultierten hingegen nicht in einer signifikanten Einschränkung der DegP-Regulation und Funktion.

In weiterführenden Bindungsstudien wurde gezeigt, dass Aktivatorpeptide lediglich mit einer reduzierten Bindungsaffinität an die getesteten L3-Mutanten binden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Bindung der Aktivatoren an die PDZ1-Domäne weiterhin stattfindet.

Beim Wildtyp-DegP wird diese Bindung vermutlich durch den Loop L3 stabilisiert und eine Kommunikation zwischen den beiden Elementen ermöglicht. Die Folge ist die Weiterleitung des Aktivierungssignals an die Proteasedomäne. Dabei scheint die Orientierung des Loop L3, die über den stabilen Stamm gewährleistet wird, von entscheidender Bedeutung zu sein.

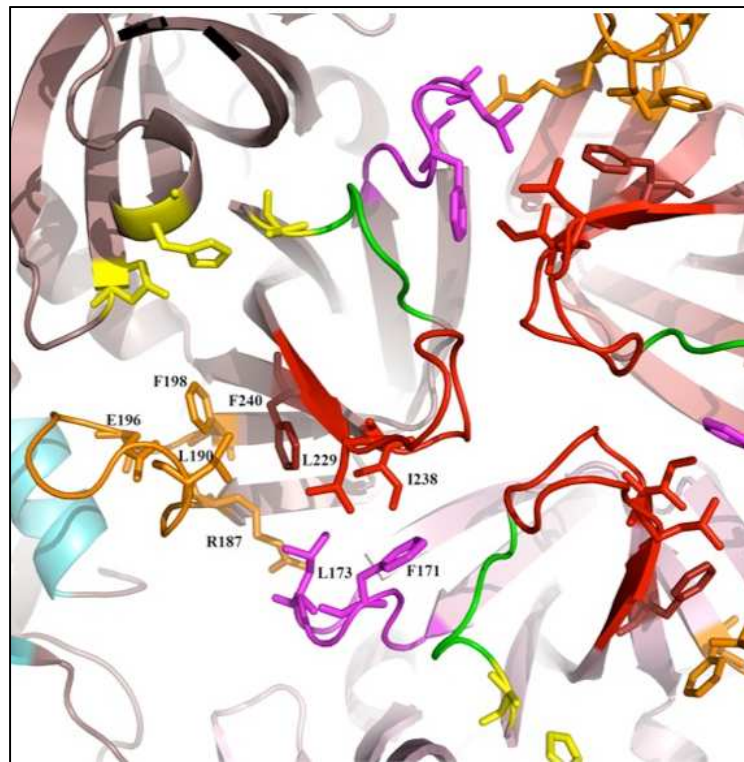


Abb. 5-1: Mutationsanalyse der Proteasedomäne von DegP

Dargestellt ist ein Ausschnitt der Proteasedomäne des DegP 24mer. Die verschiedenen Loops sind farbig hervorgehoben. Grün: L1; rot: L2; orange: L3 und magenta: LD; blau: PDZ; gelb: katalytische Triade.

Die hier beschriebene Funktion des Loop L3 weist Ähnlichkeiten zu der Funktion des Loop L3 von DegS auf. Während der allosterischen Aktivierung von DegS interagiert der Ligand gleichzeitig mit der PDZ-Domäne und dem Loop L3, was zu einer konformationellen Veränderung des Loops und zu einer strukturellen Umlagerung der Proteasedomäne führt. Trotz der ähnlichen Funktion weisen die in dieser Arbeit erhaltenen Daten auf einen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Proteasen hin. So scheinen DegP-Aktivatoren nicht gleichzeitig an die PDZ1-Domäne und den Loop L3 zu binden, da Mutationen im Loop L3 in diesem Fall die Bindung des Aktivators vollständig unterbinden würden.

5.4.3 Die Rolle des Loop L2 für die Funktion von DegP

Im Zusammenhang mit der Charakterisierung der Proteasedomäne wurde ein weiterer Fokus der vorliegenden Arbeit auf den Loop L2 gerichtet. Es ist bekannt, dass dieser Loop an der Bindung des Substrats und der DegP-Aktivierung beteiligt ist. Während dem N-terminalen Bereich des Loops die Beteiligung an der S1 Bindetasche zugesprochen wird, die die Spezifität für die Aminosäure an Position P₁ des Substrates bestimmt, scheint der C-terminale Bereich Bestandteil der Aktivierungsdomäne zu sein, die aus den Loops L1, L2 und LD* (*eines benachbarten Monomers) besteht. Bei Betrachtung der Kristallstrukturen des DegP-Hexamers und 24mers wird außerdem deutlich, dass die Aktivierungsdomäne im 24mer die für Serinproteasen klassische Konformation einnimmt (siehe Abb. 5-1), während sie im hexameren Partikel ungeordnet vorliegt (Perona und Craik, 1997; Krojer *et al.*, 2002; Krojer *et al.*, 2008a).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verdeutlichen die wichtige Rolle des Loop L2 für die Funktion und Regulation von DegP (siehe 4.4). Es wurde gezeigt, dass der C-Terminus des Loops eine bedeutsame Rolle für die proteolytische Aktivität, die Aktivierbarkeit und die Oligomerisierung von DegP einnimmt. Punktmutanten in diesem Bereich (DegP_{L229A}, DegP_{I238A}, DegP_{F240A}) zeigten eine stark eingeschränkte proteolytische Aktivität, einen Defekt in der Aktivierbarkeit und erst der Einsatz sehr hoher Aktivatorkonzentrationen führte zu der Ausbildung höherer Oligomere (12mer/24mer). In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass die Aminosäuren L229, I238 und F240 im Rahmen der Aktivierung mit den Aminosäuren F171 und L173 des Loop LD* interagieren (siehe Abb. 5-1). Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien lassen vermuten, dass die Bindung des Aktivatorpeptids an die PDZ1 durch den Loop L2 stabilisiert wird, indem direkte oder indirekte Kontakte zwischen PDZ1-Domäne und dem C-Terminus des Loop L2 zustande kommen. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Aktivatorpeptide mit einer reduzierten Affinität an die hier getesteten L2-Mutanten binden. Es wird vermutet, dass Peptide trotz der Mutationen im C-Terminus des Loops weiterhin an die PDZ1-Domäne binden, allerdings keine Stabilisierung der Bindung und somit eine nur eingeschränkte Aktivierung stattfindet.

Eine derartige Rolle für den N-Terminus des Loop L2 wurde in dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Wie bereits in 5.2.2 diskutiert, führte die Mutation I228A zu einer leicht veränderten Sequenzspezifität des aktiven Zentrums, die nicht zu dem Verlust der proteolytischen Aktivität führte. Die intakte proteolytische Aktivität dieser Punktmutante lässt sich durch die in 5.2.3 bereits diskutierte prozessive Hydrolyse der DegP-Substrate erklären.

Trotz einer leicht veränderten Substratspezifität und einer eventuell damit verbunden verminderten Bindungsaffinität werden Substrate weiterhin aufgrund ihrer hohen lokalen Konzentration innerhalb des DegP-Partikels hydrolysiert.

5.5 Allosterische Aktivierung und Oligomerisierung von DegP-

Ein mechanistisches Modell

Die durch diese Arbeit erzielten Ergebnisse und aufgestellten Hypothesen (vergleiche 5.1 - 5.4) sowie die Erkenntnisse aus den Kristallstrukturen des DegP-Hexamers und 24mers lassen sich zu einem möglichen mechanistischen Modell der DegP-Regulation zusammenfassen. Dieses Modell beschreibt erstmals, wie die Bindung eines Effektors die Aktivierung und die Veränderung des oligomeren Zustandes von DegP induziert.

Im hexameren Ruhezustand ragt der Loop LA eines Monomers in das aktive Zentrum eines gegenüberliegenden Monomers und interagiert dort mit den Loops L1 und L2 (Krojer *et al.*, 2002). Diese Interaktion blockiert das aktive Zentrum und verzerrt die S1 Bindetasche der Proteasedomäne, so dass diese proteolytisch inaktiv vorliegt (siehe Abb. 5-2). Binden Peptide im Zuge der Aktivierung an die PDZ1-Domäne, verursachen diese eine Umlagerung verschiedener Elemente von DegP. Dabei interagiert Loop L3 mit der PDZ1-Domäne und Loop LD* (*eines benachbarten Monomers). Loop LD* bildet zusammen mit Loop L2 die Aktivierungsdomäne von DegP. Die beschriebene Kommunikation führt zu der Ausbildung eines funktionsfähigen aktiven Zentrums (siehe Abb. 5-2; Krojer *et al.*, 2008a).

Die Bindung des Aktivators an die PDZ1-Domäne induziert in diesem Zusammenhang nicht nur die strukturelle Umlagerung innerhalb eines Monomers, sondern initiiert ebenfalls die mit der Aktivierung einhergehende Ausbildung der höheren oligomeren Strukturen (12mer / 24mer). Mit hoher Wahrscheinlichkeit findet dabei zuerst der Zerfall des Hexamers zu trimeren Strukturen statt, bevor diese zum 24mer assemblieren. Im Innenraum des 24mer können fehlgefaltete Proteine anschließend hoch effizient prozessiv degradiert werden. Liegen Proteine gefaltet vor, werden sie aufgrund ihrer Struktur vor der Degradation geschützt.

Mit Bezug auf das klassische Monod-Wyman-Changeux Model (vergleiche 5.1) kann die allosterische Aktivierung von DegP als eine durch einen Aktivator induzierte Umlagerung zwischen der starren, ungebundenen T-Struktur und der flexiblen, substratgebundenen R-Struktur beschrieben werden. Die hexamere substratgebundene R-Struktur zerfällt vermutlich zu Trimeren, die anschließend zu dem proteolytisch aktiven 24mer assemblieren (Krojer *et*

al., 2008a). Dabei ist die Proteasefunktion reversibel aktivierbar, was bedeutet, dass DegP nach der kompletten Proteolyse des Substrats vorwiegend als T-Struktur vorliegt.

Der Vergleich zu klassischen monomeren Serinproteasen verdeutlicht einen wesentlichen Unterschied zu DegP. Klassische monomere Serinproteasen wie Trypsin besitzen eine Aktivierungsdomäne, die aus den Loops L1, L2 und LD gebildet wird. (Huber und Bode, 1978; Hedstrom, 2002; Zeth, 2004), wohingegen die Aktivierungsdomäne von DegP durch den Loop L3 und die PDZ1-Domäne erweitert wird (siehe Abb. 5-2). Die zusätzliche Beteiligung dieser Elemente an der Aktivierung und die zusätzliche Regulation der Protease über die Oligomerisierung ermöglicht die überaus komplexe Regulation und Funktion von DegP.

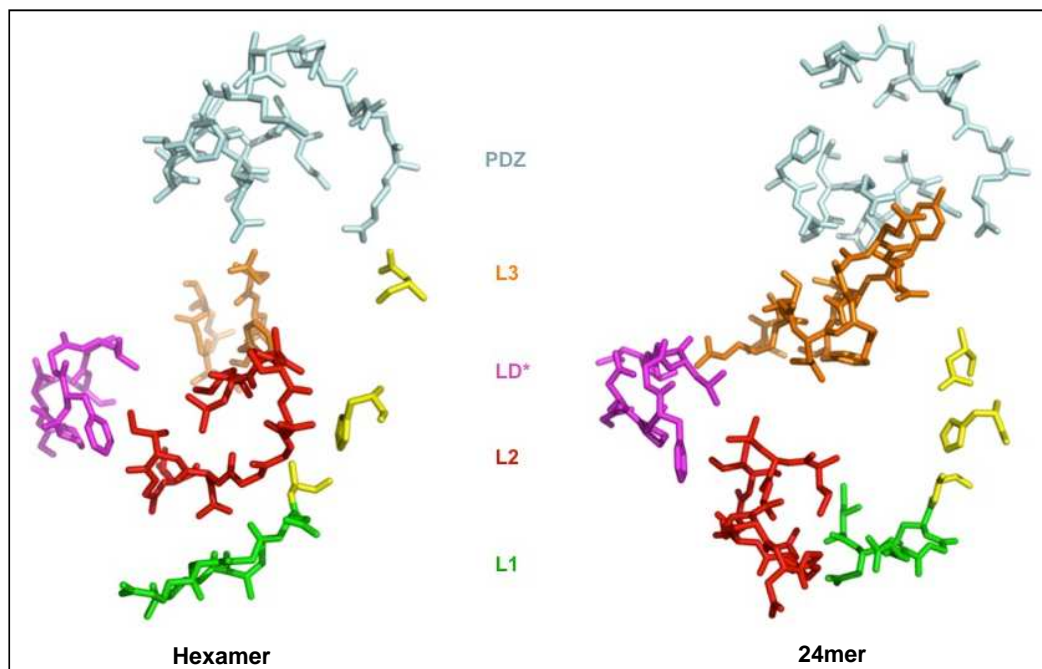


Abb. 5-2: Position der relevanten Domänen von DegP im Hexamer und 24mer

Dargestellt ist der Vergleich der für die Funktion und Regulation von DegP relevanten Elemente in der inaktiven und aktiven Konformation. Die konformationelle Veränderung dieser Elemente bei der Konversion von Hexamer (links) zu 24mer (rechts) werden deutlich. Grün: L1; rot: L2; orange: L3; magenta: LD* (*eines benachbarten Monomers); blau: PDZ1; gelb: katalytische Triade.

5.6 Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Regulation von DegP und DegS

DegS gehört, wie DegP, zu der HtrA-Proteasefamilie und besteht im Unterschied zu DegP aus nur einer PDZ-Domäne und einer Proteasedomäne. In der Zelle liegt trimeres DegS membrangebunden vor und katalysiert den Geschwindigkeits bestimmenden Schritt in der σ^E -Signalkaskade (Walsh *et al.*, 2003; Young and Hartl, 2003; Chaba *et al.*, 2007). Wie DegP wird DegS reversibel allosterisch aktiviert. Dabei inhibiert die PDZ-Domäne unter stressfreien Bedingungen die Proteasefunktion, in dem relevante Strukturen im inaktiven Zustand fixiert werden (Walsh *et al.*, 2003; Wilken *et al.*, 2004; Sohn *et al.*, 2007; Cezairliyan und Sauer, 2007; Hasselblatt *et al.*, 2007). Unter Stressbedingungen binden C-terminale Sequenzen fehlgefalteter Außenmembranproteine an die PDZ-Domäne. Diese Bindung führt zu einer Uorientierung der PDZ-Domäne und zu einer Umstrukturierung der Loops L1, L2 und LD der Proteasedomäne, so dass ein funktionsfähiges aktives Zentrum entsteht. Dabei binden Aktivatorpeptide nicht nur an die PDZ-Domäne, sondern gleichzeitig auch an den Loop L3, der die Übertragung des Signals von PDZ-Domäne auf Proteasedomäne ermöglicht. Die genaue Positionierung der PDZ-Domäne ist dabei entscheidend für die Regulation.

Auch DegP wird durch die Bindung von Peptiden allosterisch und reversibel aktiviert. Interessanterweise aktivieren die C-Termini von Außenmembranproteinen sowohl DegS als auch DegP (Meltzer *et al.*, 2008). Dies zeigt, dass eine effektive zelluläre Stressantwort wahrscheinlich über zwei Wege stattfindet. Über die Bindung des Liganden an DegS wird dabei der σ^E -Weg initiiert, der zu der vermehrten Expression verschiedener Stressgene führt, wobei eines dieser Stressgene *degP* ist (Walsh *et al.*, 2003; Ades, 2004; Ehrmann und Clausen, 2004; Duguay und Silhavy, 2004; Wilken *et al.*, 2004; Ruiz und Silhavy, 2005; Chaba *et al.*, 2007). Auf der anderen Seite führt die Bindung des Aktivators an DegP zu der allosterischen Aktivierung dieser Protease, so dass fehlgefaltete Außenmembranproteine direkt degradiert werden (Spiess *et al.*, 1999).

Wie bei DegS liegt die Aktivierungsdomäne von DegP im hexameren Ruhezustand unstrukturiert und verzerrt vor. Die Bindung von Aktivatoren an die PDZ1-Domäne induziert ebenfalls Umstrukturierungen der Proteasedomäne, die in einem proteolytisch aktiven Enzym resultieren. Dabei sind dieselben Strukturelemente (PDZ, L3, LD, L2, L1) bei beiden Proteasen beteiligt (Hasselblatt *et al.*, 2007; Meltzer, 2008; Krojer *et al.*, 2008a, Krojer *et al.*, 2008b).

Trotz der hier beschriebenen Gemeinsamkeiten und der hohen Sequenzhomologie von DegP und DegS unterscheiden sich diese Proteasen mechanistisch in einigen Punkten voneinander.

Während für DegS eine hohe Substratspezifität vermutet wird, wurde im Laufe dieser Arbeit erörtert, dass DegP eine eher niedrige Substratspezifität besitzt. Dieser Unterschied ist vereinbar mit der unterschiedlichen *in vivo* Funktion der beiden Proteasen. Während DegS den Geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der σ^E -Signalkaskade durchführt, in der es RseA spezifisch in seiner periplasmatischen Region schneidet, erfüllt DegP als Hitzeschockprotein der Proteinaqualitätskontrolle eine *Housecleaningfunktion* (Struyve *et al.*, 1991; Walsh *et al.*, 2003; Sohn *et al.*, 2007).

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Proteasen, der ebenfalls mit der unterschiedlichen *in vivo* Funktion der beiden Moleküle vereinbar ist, besteht in der Verknüpfung der Aktivierung und der Proteolyse. Während Aktivatoren und Substrate bei DegS durch verschiedene Moleküle gebildet werden, sind DegP-Substrate gleichzeitig Aktivatoren, die zu einer positiven Autoregulation ihrer prozessiven Proteolyse beitragen. Wie im Laufe dieser Arbeit gezeigt wurde, geht die Aktivierung von DegP dabei einher mit einer Umlagerung zu höheren Oligomeren, wohingegen DegS sowohl im inaktiven als auch im aktiven Zustand als Trimer vorliegt.

Der Vergleich der beiden HtrA-Proteasen verdeutlicht, dass es einige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede gibt, die mit der unterschiedlichen *in vivo* Funktion vereinbar sind. Um weitere Erkenntnisse zu erlangen, werden derzeit laborinterne Untersuchungen mit DegS/DegP-Hybriden, die Austausche einzelner Strukturelemente beinhalten, durchgeführt (Hasenbein, unveröffentlicht).

5.7 Ausblick

DegP gehört zu der konservierten HtrA-Proteasefamilie, deren Mitglieder in der Proteinqualitätskontrolle involviert sind und so wichtige physiologische Rollen in lebenden Zellen einnehmen (Clausen *et al.*, 2002; Ehrmann und Clausen, 2004; Page und Di Cera, 2008). Aufgrund dieser Funktion sind HtrA-Proteasen in der bakteriellen Pathogenese und in diversen humanen Proteinfaltungskrankheiten involviert (Selkoe, 2004; Grau *et al.*, 2005; Macario und Conway de Macario, 2005; Plun-Favreau *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 2009; Kooistra *et al.*, 2009). Die Aufdeckung molekularer Details im Bezug auf Funktion und Regulation der Familienmitglieder ist daher eine fundamentale und wichtige biologische Zielsetzung.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse resultieren in einem mechanistischen Modell der DegP-Regulation. Sie verdeutlichen, dass DegP sowohl über eine Domänenübergreifende Interaktion (PDZ1-/Proteasedomäne) als auch über die Ausbildung verschiedener oligomerer

Zustände aktiviert wird. Beide Regulationsmechanismen hängen dabei voneinander ab und ermöglichen die überaus komplexe Regulation.

Um weitere Einblicke in den Mechanismus der DegP-Aktivierung und Oligomerisierung zu erlangen und das hier aufgestellte Modell zu kräftigen, sind weitere Mutantenanalysen durchzuführen. Im Besonderen sind Analysen von PDZ2- und LD-Punktmutanten interessant. Darüber hinaus können Untersuchungen von Doppelmutanten, wie zum Beispiel L3/PDZ1-Mutanten oder L3/LD-Mutanten Aufschluss über die Rolle einzelner Aminosäuren für die Weiterleitung des Aktivierungssignals geben. Bisher ist weder die Rolle der PDZ1-Domäne für die Ausbildung des Hexamers bekannt, noch die Frage, ob Hexamere zu Trimeren zerfallen bevor sie zu höheren proteolytisch aktiven Oligomeren assemblieren, eindeutig geklärt. Weitere ITC-Analysen, die die Bindung zwischen quervernetzten isolierten Oligomeren und verschiedenen DegP-Aktivatoren untersuchen, sind ebenfalls für die weitere Aufklärung des Aktivierungsmechanismus interessant.

In einer neueren Studie zeigten Shen *et al.*, dass DegP in der Abwesenheit von Substraten an Lipidmembranen zu kugelförmigen höheren Oligomeren assembliert. Es wurde postuliert, dass die PDZ-Domänen die Bindung an die negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide vermitteln (Krojer *et al.*, 2008a). Es ist möglich, dass die in der beschriebenen Studie identifizierten DegP-Oligomere Intermediate zwischen inaktiven und aktiven DegP-Partikeln darstellen oder auf einen alternativen substratunabhängigen Mechanismus der DegP-Aktivierung hinweisen. Der direkte Nachweis dieser Strukturen *in vivo* würde in diesem Zusammenhang weiteren Aufschluss über die Funktion geben. Auch ITC-Analysen, in denen die Bindung zwischen Phospholipiden und DegP bzw. seinen PDZ-Domänen untersucht wird, können zur Klärung der Frage beitragen, welche Rolle die membranvermittelte Oligomerisierung spielt und wie die PDZ-Domänen in diesen Prozess involviert sind.

Ein weiteres Forschungsziel sollte die Identifizierung von DegP-Inhibitoren sein, die als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer spezifischer Antibiotika verwendet werden können. Da DegP eine wichtige Rolle in der bakteriellen Proteinqualitätskontrolle einnimmt und essentiell für das Überleben der Bakterienzelle ist, wäre die Wirksamkeit eines Antibiotikums gesichert und die Wahrscheinlichkeit des Auftretens möglicher spontaner Resistenzen wesentlich verringert (Lipinska *et al.*, 1988). In diesem Zusammenhang ist die Identifizierung dieser Substanzen über High Throughput Screens (HTS) eine Möglichkeit.

Das hier aufgestellte Modell der DegP-Regulation kann im Weiteren zu der Aufklärung der Regulationsmechanismen anderer HtrA-Proteasen beitragen. Dabei besteht ein besonderes

Interesse an der Aufklärung der Regulationsmechanismen humaner HtrA-Proteasen, die die einzigen PDZ-Proteasen im humanen Proteom darstellen.

Von großem medizinischen Interesse ist in diesem Zusammenhang das humane HtrA1, dem eine Rolle in der Tumorentstehung und Progression, sowie in Proteinfaltungskrankheiten wie Arthritis, Morbus Parkinson und der Alzheimerschen Krankheit zugesprochen wird (Buiyan und Fukunaga, 2009; Chien *et al.*, 2009; Clausen *et al.*, 2002; Grau *et al.*, 2005; Milner *et al.*, 2008). Identifizierte HtrA1-Modulatoren können als mögliche Leitstrukturen für die Medikamententwicklung zur Heilung dieser Proteinfaltungskrankheiten eingesetzt werden.

In einer neuen Studie zeigten Zhang *et al.*, dass die PDZ-Domäne des humanen Dishevelled Proteins, das einen Regulator im Wnt Signalweg darstellt, sowohl C-terminale als auch interne Peptide erkennt (Zhang *et al.*, 2009). Es wird postuliert, dass die Bindung dieser Liganden zu der Inhibierung des Wnt Signalwegs führt, der in der Tumورprogression involviert ist. Zusammen mit den Ergebnissen zu HtrA1 weisen die Ergebnisse der beschriebenen Studie darauf hin, dass humane PDZ-Proteine potentielle Zielstrukturen für Medikamente gegen Krankheiten wie Krebs darstellen.

6 Literatur

- Ades, S.E. (2004) Control of the alternative sigma factor sigmaE in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol.* 7: 157-162.
- Ades, S.E., Connolly, L.E., Alba, B.M. und Gross, C.A. (1999) The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev.* 13: 2449-2461.
- Akiyama, Y., Kanehara, K. und Ito, K. (2004) RseP (YaeL), an *Escherichia coli* RIP protease, cleaves transmembrane sequences. *EMBO J.* 23: 4434-4442.
- Alba, B.M. und Gross, C.A. (2004) Regulation of the *Escherichia coli* sigma-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol.* 52: 613-619.
- Alba, B.M., Leeds, J.A., Onufryk, C., Lu, C.Z. und Gross, C.A. (2002) DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev.* 16: 2156-2168.
- Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science.* 181: 223-230.
- Anfinsen, C.B. und Haber, E. (1961) Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem.* 236: 1361-1363.
- Arie, J.P., Sassoon, N. und Betton, J.M. (2001) Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 39: 199-210.
- Baldi, A., De Luca, A., Morini, M., Battista, T., Felsani, A., Baldi, F. *et al.* (2002) The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene.* 21: 6684-6688.
- Baldi, A., Mottolese, M., Vincenzi, B., Campioni, M., Mellone, P., Di Marino, M. *et al.* (2008) The serine protease HtrA1 is a novel prognostic factor for human mesothelioma. *Pharmacogenomics.* 9: 1069-1077.
- Barbas, J.A., Vazquez, D. und Rodriguez-Tebar, A. (1985) Final steps of the maturation of Omp F, a major protein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 188: 73-76.
- Bardwell, J.C., McGovern, K. und Beckwith, J. (1991) Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell.* 67: 581-589.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D. und Woessner, J.F. (2004) Handbook of proteolytic enzymes. Elsevier, London, UK.
- Basle, A., Rummel, G., Storici, P., Rosenbusch, J.P. und Schirmer, T. (2006) Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *J Mol Biol.* 362: 933-942.
- Beebe, K.D., Shin, J., Peng, J., Chaudhury, C., Khera, J. und Pei, D. (2000) Substrate recognition through a PDZ domain in tail-specific protease. *Biochemistry.* 39: 3149-3155.
- Beidler, J.L., Hilliard, P.R. und Rill, R.L. (1982) Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal Biochem.* 126: 374-380.
- Beissinger, M. und Buchner, J. (1998) How chaperones fold proteins. *Biol Chem.* 379: 245-259.
- Berkmen, M., Boyd, D. und Beckwith, J. (2007) Disulfide bond formation in the periplasm. In *The Periplasm*. Edited by Ehrmann, M. ASM Press, Washington, D.C.
- Betton, J.M., Sassoon, N., Hofnung, M. und Laurent, M. (1998) Degradation versus aggregation of misfolded maltose-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 273: 8897-8902.

- Bhuiyan, M.S. und Fukunaga, K. (2009) Mitochondrial serine protease HtrA2/Omi as a potential therapeutic target. *Curr Drug Targets*. 10: 372-383.
- Bode, W. und Huber, R. (1976) Induction of the bovine trypsinogen-trypsin transition by peptides sequentially similar to the N-terminus of trypsin. *FEBS Lett*. 68: 231-236.
- Bogaerts, V., Nuytemans, K., Reumers, J., Pals, P., Engelborghs, S., Pickut, B. *et al.* (2008) Genetic variability in the mitochondrial serine protease HTRA2 contributes to risk for Parkinson disease. *Hum Mutat*. 29: 832-840.
- Bohn, C., Collier, J. und Boulloc, P. (2004) Dispensable PDZ domain of *Escherichia coli* YaeL essential protease. *Mol Microbiol*. 52: 427-435.
- Boisguerin, P., Ay, B., Radziwill, G., Fritz, R.D., Moelling, K. und Volkmer, R. (2007) Characterization of a putative phosphorylation switch: adaptation of SPOT synthesis to analyze PDZ domain regulation mechanisms. *Chembiochem*. 8: 2302-2307.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W. *et al.* (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*. 2: 95-113.
- Bowden, M.A., Di Nezza-Cossens, L.A., Jobling, T., Salamonsen, L.A. und Nie, G. (2006) Serine proteases HTRA1 and HTRA3 are down-regulated with increasing grades of human endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 103: 253-260.
- Boyd, D., Manoil, C. und Beckwith, J. (1987) Determinants of membrane protein topology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84: 8525-8529.
- Boyd, D., Schierle, C. und Beckwith, J. (1998) How many membrane proteins are there? *Protein Sci*. 7: 201-205.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L. *et al.* (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature*. 371: 578-586.
- Brakeman, P.R., Lanahan, A.A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C.A., Huganir, R.L. *et al.* (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature*. 386: 284-288.
- Brass, J.M., Higgins, C.F., Foley, M., Rugman, P.A., Birmingham, J. und Garland, P.B. (1986) Lateral diffusion of proteins in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 165: 787-795.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. und Parker, J. (2000) Biology of Microorganisms. *Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey*. 9: Kapitel 3 und 13.
- Bukau, B. (1999) Molecular Chaperones and Folding Catalysts: Regulation, Cellular Function and Mechanisms. *Harwood Academic Publishers*.
- Bukau, B. und Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 92: 351-366.
- Burton, B.M., Williams, T.L. und Baker, T.A. (2001) ClpX-mediated remodeling of mu transpososomes: selective unfolding of subunits destabilizes the entire complex. *Mol Cell*. 8: 449-454.
- Campbell, E.A., Tupy, J.L., Gruber, T.M., Wang, S., Sharp, M.M., Gross, C.A. *et al.* (2003) Crystal structure of *Escherichia coli* sigmaE with the cytoplasmic domain of its anti-sigma RseA. *Mol Cell*. 11: 1067-1078.
- Casadaban, M.J. (1976) Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol*. 104: 541-555.

- CastilloKeller, M. und Misra, R. (2003) Protease-deficient DegP suppresses lethal effects of a mutant OmpC protein by its capture. *J Bacteriol.* 185: 148-154.
- Cezairliyan, B.O. und Sauer, R.T. (2007) Inhibition of regulated proteolysis by RseB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 3771-3776.
- Chaba, R., Grigorova, I.L., Flynn, J.M., Baker, T.A. und Gross, C.A. (2007) Design principles of the proteolytic cascade governing the sigmaE-mediated envelope stress response in *Escherichia coli*: keys to graded, buffered, and rapid signal transduction. *Genes Dev.* 21: 124-136.
- Chen, J., Song, J.L., Zhang, S., Wang, Y., Cui, D.F. und Wang, C.C. (1999) Chaperone activity of DsbC. *J Biol Chem.* 274: 19601-19605.
- Chen, R. und Henning, U. (1996) A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins. *Mol Microbiol.* 19: 1287-1294.
- Chien, J., Campioni, M., Shridhar, V. und Baldi, A. (2009) HtrA serine proteases as potential therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 9: 451-468.
- Chien, J., Staub, J., Hu, S.I., Erickson-Johnson, M.R., Couch, F.J., Smith, D.I. *et al.* (2004) A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene.* 23: 1636-1644.
- Chopra, I., Hodgson, J., Metcalf, B. und Poste, G. (1997) The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 497-503.
- Christopherson, K.S., Hillier, B.J., Lim, W.A. und Bredt, D.S. (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem.* 274: 27467-27473.
- Chu, D.T., Plattner, J.J. und Katz, L. (1996) New directions in antibacterial research. *J Med Chem.* 39: 3853-3874.
- Clausen, T., Southan, C. und Ehrmann, M. (2002) The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell.* 10: 443-455.
- Cohen, M.L. (2000) Changing patterns of infectious disease. *Nature.* 406: 762-767.
- Cosma, C.L., Danese, P.N., Carlson, J.H., Silhavy, T.J. und Snyder, W.B. (1995) Mutational activation of the Cpx signal transduction pathway of *Escherichia coli* suppresses the toxicity conferred by certain envelope-associated stresses. *Mol Microbiol.* 18: 491-505.
- Dallas-Yang, Q., Jiang, G. und Sladek, F.M. (1998) Avoiding false positives in colony PCR. *BioTechniques.* 24: 580-582.
- Danese, P.N., Oliver, G.R., Barr, K., Bowman, G.D., Rick, P.D. und Silhavy, T.J. (1998) Accumulation of the enterobacterial common antigen lipid II biosynthetic intermediate stimulates degP transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 180: 5875-5884.
- Danese, P.N. und Silhavy, T.J. (1998) Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet.* 32: 59-94.
- Danese, P.N., Snyder, W.B., Cosma, C.L., Davis, L.J. und Silhavy, T.J. (1995) The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes Dev.* 9: 387-398.
- Dartigalongue, C., Missiakas, D. und Raina, S. (2001) Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem.* 276: 20866-20875.
- De Las Penas, A., Connolly, L. und Gross, C.A. (1997) The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE. *Mol Microbiol.* 24: 373-385.

- Dong, H., O'Brien, R.J., Fung, E.T., Lanahan, A.A., Worley, P.F. und Huganir, R.L. (1997) GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature*. 386: 279-284.
- Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. und MacKinnon, R. (1996) Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell*. 85: 1067-1076.
- Driessen, A.J. und Nouwen, N. (2008) Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem*. 77: 643-667.
- Dubochet, J., McDowell, A.W., Menge, B., Schmid, E.N. und Lickfeld, K.G. (1983) Electron microscopy of frozen-hydrated bacteria. *J Bacteriol*. 155: 381-390.
- Duguay, A.R. und Silhavy, T.J. (2004) Quality control in the bacterial periplasm. *Biochim Biophys Acta*. 1694: 121-134.
- Eaton, W.A., Henry, E.R., Hofrichter, J. und Mozzarelli, A. (1999) Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood? *Nat Struct Biol*. 6: 351-358.
- Ehrmann, M. (2005) Protein Folding in the Periplasm and Outer Membrane of *E. coli*. In *Protein Folding Handbook*. Edited by Buchner, J. and Kiefhaber, T. . Wiley-Vch Verlag.
- Ehrmann, M. und Clausen, T. (2004) Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu Rev Genet*. 38: 709-724.
- Ellis, R.J. und Hartl, F.U. (1999) Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol*. 9: 102-110.
- Esposito, V., Campioni, M., De Luca, A., Spugnini, E.P., Baldi, F., Cassandro, R. *et al.* (2006) Analysis of HtrA1 serine protease expression in human lung cancer. *Anticancer Res*. 26: 3455-3459.
- Fairbanks, G., Steck, T.L. und Wallach, D.F. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*. 10: 2606-2617.
- Fan, J.S. und Zhang, M. (2002) Signaling complex organization by PDZ domain proteins. *Neurosignals*. 11: 315-321.
- Fanning, A.S. und Anderson, J.M. (1999) PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest*. 103: 767-772.
- Fanning, A.S., Lye, M.F., Anderson, J.M. und Lavie, A. (2007) Domain swapping within PDZ2 is responsible for dimerization of ZO proteins. *J Biol Chem*. 282: 37710-37716.
- Fersht, A. (1999) Structure and Mechanism in Protein Science. *W H Freeman, New York*.
- Fischer, G. und Aumuller, T. (2003) Regulation of peptide bond cis/trans isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 148: 105-150.
- Flynn, J.M., Levchenko, I., Sauer, R.T. und Baker, T.A. (2004) Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. *Genes Dev*. 18: 2292-2301.
- Fouassier, L., Yun, C.C., Fitz, J.G. und Doctor, R.B. (2000) Evidence for ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) self-association through PDZ-PDZ interactions. *J Biol Chem*. 275: 25039-25045.
- Fox, P.F. (1989) *The milk protein system*. in *Developments in Dairy Chemistry - 4 Functional Milk Proteins*. In Edited by Fox, P.F. pp. 1-53. Elsevier Applied Sciences, New York, NY.

- Frank, R. (2002) The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports - principles and applications. *J Immunol Methods*. 267: 13-26.
- Gee, S.H., Sekely, S.A., Lombardo, C., Kurakin, A., Froehner, S.C. und Kay, B.K. (1998) Cyclic peptides as non-carboxyl-terminal ligands of syntrophin PDZ domains. *J Biol Chem*. 273: 21980-21987.
- Genevaux, P., Georgopoulos, C. und Kelley, W.L. (2007) The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Mol Microbiol*. 66: 840-857.
- Georgopoulos, C. (2006) Toothpicks, serendipity and the emergence of the *Escherichia coli* DnaK (Hsp70) and GroEL (Hsp60) chaperone machines. *Genetics*. 174: 1699-1707.
- Goff, S.A. und Goldberg, A.L. (1985) Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell*. 41: 587-595.
- Gonzalez-Montalban, N., Carrio, M.M., Cuatrecasas, S., Aris, A. und Villaverde, A. (2005) Bacterial inclusion bodies are cytotoxic in vivo in absence of functional chaperones DnaK or GroEL. *J Biotechnol*. 118: 406-412.
- Gordon, G., Gayda, R.C. und Markovitz, A. (1984) Sequence of the regulatory region of *omp T*, the gene specifying major outer membrane protein a (3b) of *Escherichia coli* K-12: implications for regulation and processing. *Mol Gen Genet*. 193: 414-421.
- Gothel, S.F. und Marahiel, M.A. (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci*. 55: 423-436.
- Gottesman, S. (2003) Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 19: 565-587.
- Gram, C. (1884) Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin*, 2: 185-189.
- Grau, S. (2004) Expression and Characterization of a human serine protease in *E. coli*.
- Grau, S., Baldi, A., Bussani, R., Tian, X., Stefanescu, R., Przybylski, M. *et al.* (2005) Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 6021-6026.
- Gupta, S., Singh, R., Datta, P., Zhang, Z., Orr, C., Lu, Z. *et al.* (2004) The C-terminal tail of presenilin regulates Omi/HtrA2 protease activity. *J Biol Chem*. 279: 45844-45854.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 166: 557-580.
- Hara, K., Shiga, A., Fukutake, T., Nozaki, H., Miyashita, A., Yokoseki, A. *et al.* (2009) Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *N Engl J Med*. 360: 1729-1739.
- Harms, N., Koningstein, G., Dontje, W., Muller, M., Oudega, B., Luirink, J. *et al.* (2001) The early interaction of the outer membrane protein *phoE* with the periplasmic chaperone Skp occurs at the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem*. 276: 18804-18811.
- Harris, B.Z. und Lim, W.A. (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci*. 114: 3219-3231.
- Harrison, S.C. (1996) Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains. *Cell*. 86: 341-343.
- Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 381: 571-579.

- Hasselblatt, H., Kurzbauer, R., Wilken, C., Krojer, T., Sawa, J., Kurt, J. *et al.* (2007) Regulation of the sigmaE stress response by DegS: how the PDZ domain keeps the protease inactive in the resting state and allows integration of different OMP-derived stress signals upon folding stress. *Genes Dev.* 21: 2659-2670.
- Hattendorf, D.A. und Lindquist, S.L. (2002) Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. *EMBO J.* 21: 12-21.
- Hauske, P., Meltzer, M., Ottmann, C., Krojer, T., Clausen, T., Ehrmann, M. *et al.* (2009) Selectivity profiling of DegP substrates and inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 17: 2920-2924.
- Hedstrom, L. (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev.* 102: 4501-4524.
- Hillier, B.J., Christopherson, K.S., Prehoda, K.E., Brecht, D.S. und Lim, W.A. (1999) Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science.* 284: 812-815.
- Horwich, A.L., Weber-Ban, E.U. und Finley, D. (1999) Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 11033-11040.
- Houry, W.A. (2001) Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm. *Curr Protein Pept Sci.* 2: 227-244.
- Hu, S.I., Carozza, M., Klein, M., Nantermet, P., Luk, D. und Crawl, R.M. (1998) Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem.* 273: 34406-34412.
- Huber, R. und Bode, W. (1978) Structural basis of the activation and action of trypsin. *J Mol Biol.* 114-122.
- Huber, R., Kukla, D., Bode, W., Schwager, P., Bartels, K., Deisenhofer, J. *et al.* (1974) Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol.* 89: 73-101.
- Huttunen, H.J., Guenette, S.Y., Peach, C., Greco, C., Xia, W., Kim, D.Y. *et al.* (2007) HtrA2 regulates beta-amyloid precursor protein (APP) metabolism through endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem.* 282: 28285-28295.
- Inaba, K., Suzuki, M., Maegawa, K., Akiyama, S., Ito, K. und Akiyama, Y. (2008) A pair of circularly permuted PDZ domains control RseP, the S2P family intramembrane protease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 283: 35042-35052.
- Isaac, D.D., Pinkner, J.S., Hultgren, S.J. und Silhavy, T.J. (2005) The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 17775-17779.
- Iwanczyk, J., Damjanovic, D., Kooistra, J., Leong, V., Jomaa, A., Ghirlando, R. *et al.* (2007) Role of the PDZ domains in *Escherichia coli* DegP protein. *J Bacteriol.* 189: 3176-3186.
- Jelen, F., Oleksy, A., Smietana, K. und Otlewski, J. (2003) PDZ domains - common players in the cell signaling. *Acta Biochim Pol.* 50: 985-1017.
- Jemth, P. und Gianni, S. (2007) PDZ domains: folding and binding. *Biochemistry.* 46: 8701-8708.
- Jiang, J., Zhang, X., Chen, Y., Wu, Y., Zhou, Z.H., Chang, Z. *et al.* (2008) Activation of DegP chaperone-protease via formation of large cage-like oligomers upon binding to substrate proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 11939-11944.
- Jones, C.H., Danese, P.N., Pinkner, J.S., Silhavy, T.J. und Hultgren, S.J. (1997) The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO J.* 16: 6394-6406.

- Jones, J.M., Albin, R.L., Feldman, E.L., Simin, K., Schuster, T.G., Dunnick, W.A. *et al.* (1993) Mnd2: a New Mouse Model of Inherited Motor Neuron Disease. *Genomics*. 16: 669-677.
- Jones, J.M., Datta, P., Srinivasula, S.M., Ji, W., Gupta, S., Zhang, Z. *et al.* (2003) Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice. *Nature*. 425: 721-727.
- Junqueira, D., Cilenti, L., Musumeci, L., Sedivy, J.M. und Zervos, A.S. (2003) Random mutagenesis of PDZ(Omi) domain and selection of mutants that specifically bind the Myc proto-oncogene and induce apoptosis. *Oncogene*. 22: 2772-2781.
- Kanehara, K., Ito, K. und Akiyama, Y. (2002) YaeL (EcfE) activates the sigma(E) pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti-sigma(E), RseA. *Genes Dev*. 16: 2147-2155.
- Kang, B.S., Cooper, D.R., Jelen, F., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Dauter, Z. *et al.* (2003) PDZ tandem of human syntenin: crystal structure and functional properties. *Structure*. 11: 459-468.
- Kennedy, M.B. (1995) Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem Sci*. 20: 350.
- Kim, K.I., Park, S.C., Kang, S.H., Cheong, G.W. und Chung, C.H. (1999) Selective degradation of unfolded proteins by the self-compartmentalizing HtrA protease, a periplasmic heat shock protein in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 294: 1363-1374.
- Kirstein, J., Schlothauer, T., Dougan, D.A., Lilie, H., Tischendorf, G., Mogk, A. *et al.* (2006) Adaptor protein controlled oligomerization activates the AAA+ protein ClpC. *EMBO J*. 25: 1481-1491.
- Kleinschmidt, J.H. (2003) Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci*. 60: 1547-1558.
- Koch, A.L. (1998) The biophysics of the gram-negative periplasmic space. *Crit Rev Microbiol*. 24: 23-59.
- Koebnik, R. (2000) *In vivo* membrane assembly of split variants of the *E. coli* outer membrane protein OmpA. *EMBO J*: 3529-3537.
- Kolmar, H., Waller, P.R. und Sauer, R.T. (1996) The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J Bacteriol*. 178: 5925-5929.
- Kooistra, J., Milojevic, J., Melacini, G. und Ortega, J. (2009) A New Function of Human HtrA2 as an Amyloid-beta Oligomerization Inhibitor. *J Alzheimers Dis*. 17: 281-294.
- Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B. und Seeburg, P.H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*. 269: 1737-1740.
- Koshland, D.E., Jr, Nemethy, G. und Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*. 5: 365-385.
- Kraut, J. (1977) Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu Rev Biochem*. 46: 331-358.
- Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M. und Clausen, T. (2002) Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature*. 416: 455-459.
- Krojer, T., Pangerl, K., Kurt, J., Sawa, J., Stingl, C., Mechtler, K. *et al.* (2008b) Interplay of PDZ and protease domain of DegP ensures efficient elimination of misfolded proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 7702-7707.
- Krojer, T., Sawa, J., Schafer, E., Saibil, H.R., Ehrmann, M. und Clausen, T. (2008a) Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature*. 453: 885-890.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lau, A.G. und Hall, R.A. (2001) Oligomerization of NHERF-1 and NHERF-2 PDZ domains: differential regulation by association with receptor carboxyl-termini and by phosphorylation. *Biochemistry*. 40: 8572-8580.
- Leduc, M., Frehel, C. und van Heijenoort, J. (1985) Correlation between degradation and ultrastructure of peptidoglycan during autolysis of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 161: 627-635.
- Lee, P.A., Tullman-Ercek, D. und Georgiou, G. (2006) The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol*. 60: 373-395.
- Levin, S.A. und Andreasen, V. (1999) Disease transmission dynamics and the evolution of antibiotic resistance in hospitals and communal settings. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 800-801.
- Li, W., Srinivasula, S.M., Chai, J., Li, P., Wu, J.W., Zhang, Z. *et al.* (2002) Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat Struct Biol*. 9: 436-441.
- Li, Y., Gao, X. und Chen, L. (2009) GroEL Recognizes an Amphipathic Helix and Binds to the Hydrophobic Side. *J Biol Chem*. 284: 4324-4331.
- Lin, D., Edwards, A.S., Fawcett, J.P., Mbamalu, G., Scott, J.D. und Pawson, T. (2000) A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol*. 2: 540-547.
- Lipinska, B., Sharma, S. und Georgopoulos, C. (1988) Sequence analysis and regulation of the htrA gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res*. 16: 10053-10067.
- Lipinska, B., Zylicz, M. und Georgopoulos, C. (1990) The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. *J Bacteriol*. 172: 1791-1797.
- Livney, Y.D., Schwan, A.L. und Dalgleish, D.G. (2004) A study of beta-casein tertiary structure by intramolecular crosslinking and mass spectrometry. *J Dairy Sci*. 87: 3638-3647.
- Macario, A.J. und Conway de Macario, E. (2005) Sick chaperones, cellular stress, and disease. *N Engl J Med*. 353: 1489-1501.
- Maerkl, S.J. und Quake, S.R. (2007) A systems approach to measuring the binding energy landscapes of transcription factors. *Science*. 315: 233-237.
- Maniatis, T., Frisch, E.F. und Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marfatia, S.M., Byron, O., Campbell, G., Liu, S.C. und Chishti, A.H. (2000) Human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein forms an oligomer in solution. Identification of the self-association site. *J Biol Chem*. 275: 13759-13770.
- Martins, L.M., Iaccarino, I., Tenev, T., Gschmeissner, S., Totty, N.F., Lemoine, N.R. *et al.* (2002) The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem*. 277: 439-444.
- Martins, L.M., Morrison, A., Klupsch, K., Fedele, V., Moiso, N., Teismann, P. *et al.* (2004) Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol Cell Biol*. 24: 9848-9862.
- Martins, L.M., Turk, B.E., Cowling, V., Borg, A., Jarrell, E.T., Cantley, L.C. *et al.* (2003) Binding specificity and regulation of the serine protease and PDZ domains of HtrA2/Omi. *J Biol Chem*. 278: 49417-49427.

- Meltzer, M. (2008) Struktur- und Funktionsanalyse der hochkonservierten Stressprotease DegP von *E. coli*. Dissertation, Universität Duisburg-Essen.
- Meltzer, M., Hasenbein, S., Hauske, P., Kucz, N., Merdanovic, M., Grau, S. *et al.* (2008) Allosteric activation of HtrA protease DegP by stress signals during bacterial protein quality control. *Angew Chem Int Ed Engl.* 47: 1332-1334.
- Meltzer, M., Hasenbein, S., Mamant, N., Merdanovic, M., Poepsel, S., Hauske, P. *et al.* (2009) Structure, function and regulation of the conserved serine proteases DegP and DegS of *Escherichia coli*. *Res Microbiol.*
- Milev, S., Bjelic, S., Georgiev, O. und Jelesarov, I. (2007) Energetics of peptide recognition by the second PDZ domain of human protein tyrosine phosphatase 1E. *Biochemistry.* 46: 1064-1078.
- Miller, J. (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory.*
- Milner, J.M., Patel, A. und Rowan, A.D. (2008) Emerging roles of serine proteinases in tissue turnover in arthritis. *Arthritis Rheum.* 58: 3644-3656.
- Miot, M. und Betton, J.M. (2004) Protein quality control in the bacterial periplasm. *Microb Cell Fact.* 3: 4.
- Misra, R., CastilloKeller, M. und Deng, M. (2000) Overexpression of protease-deficient DegP(S210A) rescues the lethal phenotype of *Escherichia coli* OmpF assembly mutants in a degP background. *J Bacteriol.* 182: 4882-4888.
- Missiakas, D., Mayer, M.P., Lemaire, M., Georgopoulos, C. und Raina, S. (1997) Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol.* 24: 355-371.
- Mogk, A., Schlieker, C., Strub, C., Rist, W., Weibezahn, J. und Bukau, B. (2003) Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP hydrolysis, and chaperone activity. *J Biol Chem.* 278: 17615-17624.
- Moisoi, N., Klupsch, K., Fedele, V., East, P., Sharma, S., Renton, A. *et al.* (2009) Mitochondrial dysfunction triggered by loss of HtrA2 results in the activation of a brain-specific transcriptional stress response. *Cell Death Differ.* 16: 449-464.
- Monod, J., Wyman, J. und Changeux, J.P. (1965) On the Nature of Allosteric Transitions: a Plausible Model. *J Mol Biol.* 12: 88-118.
- Muhlradt, P.F. und Golecki, J.R. (1975) Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of *Salmonella typhimurium*. *Eur J Biochem.* 51: 343-352.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Murwantoko, Yano, M., Ueta, Y., Murasaki, A., Kanda, H., Oka, C. *et al.* (2004) Binding of proteins to the PDZ domain regulates proteolytic activity of HtrA1 serine protease. *Biochem J.* 381: 895-904.
- Nakayama, S. und Watanabe, H. (1995) Involvement of cpxA, a sensor of a two-component regulatory system, in the pH-dependent regulation of expression of *Shigella sonnei* virF gene. *J Bacteriol.* 177: 5062-5069.
- Narkiewicz, J., Lapinska-Szumczyk, S., Zurawa-Janicka, D., Skorko-Glonek, J., Emerich, J. und Lipinska, B. (2009) Expression of human HtrA1, HtrA2, HtrA3 and TGF-beta1 genes in primary endometrial cancer. *Oncol Rep.* 21: 1529-1537.
- Nelson, D.L. und Cox, M.M. (2000) Lehninger Principles of Biochemistry. *Worth Publisher.*
- Neu, H.C. (1992) The crisis in antibiotic resistance. *Science.* 257: 1064-1073.

- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L. und Koonin, E.V. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9: 27-43.
- Nikaido, H. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. ASM Press, 2nd ed, vol 1.
- Nou, X. und Kadner, R.J. (1998) Coupled changes in translation and transcription during cobalamin-dependent regulation of *btuB* expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 180: 6719-6728.
- Oberbauer, B. (1992) Theodor Escherich-Leben und Werk. *Futuamed-Verlag*.
- Oliver, D.B. (1996) Periplasm. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*. Edited by Neidhardt, F.C., Curtiss, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C. and Low, K.B. pp. 88-103. Washington DC ASM.
- Page, M.J., Carrell, C.J. und Di Cera, E. (2008) Engineering protein allostery: 1.05 Å resolution structure and enzymatic properties of a Na⁺-activated trypsin. *J Mol Biol.* 378: 666-672.
- Page, M.J. und Di Cera, E. (2008) Evolution of peptidase diversity. *J Biol Chem.* 283: 30010-30014.
- Pallen, M.J. und Wren, B.W. (1997) The HtrA family of serine proteases. *Mol Microbiol.* 26: 209-221.
- Palmer, T. und Berks, B.C. (2003) Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiology.* 149: 547-556.
- Park, H.J., Seong, Y.M., Choi, J.Y., Kang, S. und Rhim, H. (2004) Alzheimer's disease-associated amyloid beta interacts with the human serine protease HtrA2/Omi. *Neurosci Lett.* 357: 63-67.
- Pauling, L. (1935) The Oxygen Equilibrium of Hemoglobin and Its Structural Interpretation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21: 186-191.
- Peek, J.A. und Taylor, R.K. (1992) Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 6210-6214.
- Perona, J.J. und Craik, C.S. (1995) Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* 4: 337-360.
- Perutz, M.F. (1972) Nature of haem-haem interaction. *Nature.* 237: 495-499.
- Perutz, M.F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature.* 228: 726-739.
- Perutz, M.F., Wilkinson, A.J., Paoli, M. und Dodson, G.G. (1998) The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 27: 1-34.
- Plun-Favreau, H., Klupsch, K., Moiso, N., Gandhi, S., Kjaer, S., Frith, D. *et al.* (2007) The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol.* 9: 1243-1252.
- Pogliano, J., Lynch, A.S., Belin, D., Lin, E.C. und Beckwith, J. (1997) Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev.* 11: 1169-1182.
- Polgár, L. (2004) Catalytic mechanism of serine and threonine peptidases. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Edited by Barrett, A.J., Rawlings, N.D. and Woessner, J.F. pp. 1440-1448. Elsevier, London, UK.

- Ponting, C.P. (1997) Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci.* 6: 464-468.
- Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. und Beckwith, J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem.* 272: 15661-15667.
- Raivio, T.L. (2005) Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol.* 56: 1119-1128.
- Raivio, T.L. und Silhavy, T.J. (1999) The sigmaE and Cpx regulatory pathways: overlapping but distinct envelope stress responses. *Curr Opin Microbiol.* 2: 159-165.
- Ranford, J.C. und Henderson, B. (2002) Chaperonins in disease: mechanisms, models, and treatments. *Mol Pathol.* 55: 209-213.
- Rawlings, N.D. und Barrett, A.J. (2004) Introduction: serine peptidases and their clans. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Edited by Barrett, A.J., Rawlings, N.D. and Woessner, J.F. pp. 1417-1439. Elsevier.
- Rawlings, N.D. und Barrett, A.J. (1994) Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.* 244: 19-61.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P. und Barrett, A.J. (2004) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 32: D160-4.
- Rhodijs, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J. und Gross, C.A. (2006) Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol.* 4: e2.
- Rizzitello, A.E., Harper, J.R. und Silhavy, T.J. (2001) Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 183: 6794-6800.
- Rosen, B.P. (1987) ATP-coupled solute transport systems. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*. Edited by Neidhardt, F.C., Curtiss, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C. and Low, K.B. pp. 760-767. Washington DC ASM.
- Rouviere, P.E. und Gross, C.A. (1996) SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev.* 10: 3170-3182.
- Ruiz, N., Kahne, D. und Silhavy, T.J. (2006) Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 4: 57-66.
- Ruiz, N. und Silhavy, T.J. (2005) Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr Opin Microbiol.* 8: 122-126.
- Runyon, S.T., Zhang, Y., Appleton, B.A., Sazinsky, S.L., Wu, P., Pan, B. et al. (2007) Structural and functional analysis of the PDZ domains of human HtrA1 and HtrA3. *Protein Sci.* 16: 2454-2471.
- Saibil, H.R. (2008) Chaperone machines in action. *Curr Opin Struct Biol.* 18: 35-42.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J. und Russel, D. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saro, D., Klosi, E., Paredes, A. und Spaller, M.R. (2004) Thermodynamic analysis of a hydrophobic binding site: probing the PDZ domain with nonproteinogenic peptide ligands. *Org Lett.* 6: 3429-3432.

- Saro, D., Li, T., Rupasinghe, C., Paredes, A., Caspers, N. und Spaller, M.R. (2007) A thermodynamic ligand binding study of the third PDZ domain (PDZ3) from the mammalian neuronal protein PSD-95. *Biochemistry*. 46: 6340-6352.
- Sassoon, N., Arie, J.P. und Betton, J.M. (1999) PDZ domains determine the native oligomeric structure of the DegP (HtrA) protease. *Mol Microbiol*. 33: 583-589.
- Sato, T., Ito, K. und Yura, T. (1977) Membrane proteins of *Escherichia coli* K-12: two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of inner and outer membranes. *Eur J Biochem*. 78: 557-567.
- Schafer, U., Beck, K. und Muller, M. (1999) Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J Biol Chem*. 274: 24567-24574.
- Schagger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 166: 368-379.
- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A. und Lindquist, S. (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci*. 21: 289-296.
- Schlothauer, T., Mogk, A., Dougan, D.A., Bukau, B. und Turgay, K. (2003) MecA, an adaptor protein necessary for ClpC chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 2306-2311.
- Schneider, S., Buchert, M., Georgiev, O., Catimel, B., Halford, M., Stacker, S.A. *et al.* (1999) Mutagenesis and selection of PDZ domains that bind new protein targets. *Nat Biotechnol*. 17: 170-175.
- Schultz, J., Copley, R.R., Doerks, T., Ponting, C.P. und Bork, P. (2000) SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res*. 28: 231-234.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. und Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 5857-5864.
- Selkoe, D.J. (2004) Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol*. 6: 1054-1061.
- Selkoe, D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 81: 741-766.
- Seong, I.S., Kang, M.S., Choi, M.K., Lee, J.W., Koh, O.J., Wang, J. *et al.* (2002) The C-terminal tails of HslU ATPase act as a molecular switch for activation of HslV peptidase. *J Biol Chem*. 277: 25976-25982.
- Shao, F., Bader, M.W., Jakob, U. und Bardwell, J.C. (2000) DsbG, a protein disulfide isomerase with chaperone activity. *J Biol Chem*. 275: 13349-13352.
- Shen, Q.T., Bai, X.C., Chang, L.F., Wu, Y., Wang, H.W. und Sui, S.F. (2009) Bowl-shaped oligomeric structures on membranes as DegP's new functional forms in protein quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 4858-4863.
- Sheth, P.R., Hays, J.L., Elferink, L.A. und Watowich, S.J. (2008) Biochemical basis for the functional switch that regulates hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase activation. *Biochemistry*. 47: 4028-4038.
- Shotton, D.M. und Watson, H.C. (1970) Three-dimensional structure of tosyl-elastase. *Nature*. 225: 811-816.
- Shridhar, V., Sen, A., Chien, J., Staub, J., Avula, R., Kovats, S. *et al.* (2002) Identification of underexpressed genes in early- and late-stage primary ovarian tumors by suppression subtraction hybridization. *Cancer Res*. 62: 262-270.

- Singh, S.K. und Maurizi, M.R. (1994) Mutational analysis demonstrates different functional roles for the two ATP-binding sites in ClpAP protease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 269: 29537-29545.
- Sklar, J.G., Wu, T., Kahne, D. und Silhavy, T.J. (2007) Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev*. 21: 2473-2484.
- Skorko-Glonek, J., Krzewski, K., Lipinska, B., Bertoli, E. und Tanfani, F. (1995) Comparison of the structure of wild-type HtrA heat shock protease and mutant HtrA proteins. A Fourier transform infrared spectroscopic study. *J Biol Chem*. 270: 11140-11146.
- Skorko-Glonek, J., Laskowska, E., Sobiecka-Szkatula, A. und Lipinska, B. (2007) Characterization of the chaperone-like activity of HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* under the conditions of heat shock. *Arch Biochem Biophys*. 464: 80-89.
- Smith, S.G., Mahon, V., Lambert, M.A. und Fagan, R.P. (2007) A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett*. 273: 1-11.
- Snyder, W.B., Davis, L.J., Danese, P.N., Cosma, C.L. und Silhavy, T.J. (1995) Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway. *J Bacteriol*. 177: 4216-4223.
- Sohn, J., Grant, R.A. und Sauer, R.T. (2007) Allosteric activation of DegS, a stress sensor PDZ protease. *Cell*. 131: 572-583.
- Sone, M., Kishigami, S., Yoshihisa, T. und Ito, K. (1997) Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase. *J Biol Chem*. 272: 6174-6178.
- Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H. *et al.* (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*. 275: 73-77.
- Spiers, A., Lamb, H.K., Cocklin, S., Wheeler, K.A., Budworth, J., Dodds, A.L. *et al.* (2002) PDZ domains facilitate binding of high temperature requirement protease A (HtrA) and tail-specific protease (Tsp) to heterologous substrates through recognition of the small stable RNA A (ssrA)-encoded peptide. *J Biol Chem*. 277: 39443-39449.
- Spiess, C. (1999) Amylase MalS und Protease DegP aus *Escherichia coli*: Faltung und Abbau unter Kontrolle der Temperatur. .
- Spiess, C., Beil, A. und Ehrmann, M. (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*. 97: 339-347.
- Steitz, T.A. und Shulman, R.G. (1982) Crystallographic and NMR studies of the serine proteases. *Annu Rev Biophys Bioeng*. 11: 419-444.
- Strauch, K.L. und Beckwith, J. (1988) An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85: 1576-1580.
- Strauch, K.L., Johnson, K. und Beckwith, J. (1989) Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J Bacteriol*. 171: 2689-2696.
- Strauss, K.M., Martins, L.M., Plun-Favreau, H., Marx, F.P., Kautzmann, S., Berg, D. *et al.* (2005) Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 14: 2099-2111.
- Struyve, M., Moons, M. und Tommassen, J. (1991) Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol*. 218: 141-148.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. und Takahashi, R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*. 8: 613-621.

- Swamy, K.H., Chung, C.H. und Goldberg, A.L. (1983) Isolation and characterization of protease do from *Escherichia coli*, a large serine protease containing multiple subunits. *Arch Biochem Biophys.* 224: 543-554.
- Swartz, M.N. (1994) Hospital-acquired infections: diseases with increasingly limited therapies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 2420-2427.
- Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I. und Anderson, R.L. (1996) A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones.* 1: 23-28.
- Thome, B.M. und Muller, M. (1991) Skp is a periplasmic *Escherichia coli* protein requiring SecA and SecY for export. *Mol Microbiol.* 5: 2815-2821.
- Tochio, H., Zhang, Q., Mandal, P., Li, M. und Zhang, M. (1999) Solution structure of the extended neuronal nitric oxide synthase PDZ domain complexed with an associated peptide. *Nat Struct Biol.* 6: 417-421.
- Tsuchiya, A., Yano, M., Tocharus, J., Kojima, H., Fukumoto, M., Kawaichi, M. *et al.* (2005) Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone.* 37: 323-336.
- Tsunoda, S., Sierralta, J. und Zuker, C.S. (1998) Specificity in signaling pathways: assembly into multimolecular signaling complexes. *Curr Opin Genet Dev.* 8: 419-422.
- Uhland, K., Mondigler, M., Spiess, C., Prinz, W. und Ehrmann, M. (2000) Determinants of translocation and folding of TreF, a trehalase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 275: 23439-23445.
- Utepergenov, D.I., Fanning, A.S. und Anderson, J.M. (2006) Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. *J Biol Chem.* 281: 24671-24677.
- van Ham, M. und Hendriks, W. (2003) PDZ domains-glue and guide. *Mol Biol Rep.* 30: 69-82.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S.M., Rodriguez, I., Alnemri, E.S. *et al.* (2002) The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* 9: 20-26.
- van Wely, K.H., Swaving, J., Freudl, R. und Driessen, A.J. (2001) Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 25: 437-454.
- Van Wielink, J.E. und Duine, J.A. (1990) How big is the periplasmic space? *Trends Biochem Sci.* 15: 136-137.
- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M. *et al.* (2002) HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem.* 277: 445-454.
- Waller, P.R. und Sauer, R.T. (1996) Characterization of degQ and degS, *Escherichia coli* genes encoding homologs of the DegP protease. *J Bacteriol.* 178: 1146-1153.
- Walsh, C. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* 406: 775-781.
- Walsh, N.P., Alba, B.M., Bose, B., Gross, C.A. und Sauer, R.T. (2003) OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell.* 113: 61-71.
- Wang, G.J., Gao, C.F., Wei, D., Wang, C. und Ding, S.Q. (2009) Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 15: 1427-1430.
- Wang, Y., Luo, W. und Reiser, G. (2008) Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. *Cell Mol Life Sci.* 65: 237-252.

- Weber-Ban, E.U., Reid, B.G., Miranker, A.D. und Horwich, A.L. (1999) Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature*. 401: 90-93.
- Wickner, S., Gottesman, S., Skowrya, D., Hoskins, J., McKenney, K. und Maurizi, M.R. (1994) A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 12218-12222.
- Wickner, S., Maurizi, M.R. und Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*. 286: 1888-1893.
- Wilken, C. (2006) Crystal Structure of the Periplasmic Stress Sensor DegS.
- Wilken, C., Kitzing, K., Kurzbauer, R., Ehrmann, M. und Clausen, T. (2004) Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease. *Cell*. 117: 483-494.
- Wolter, E. (2009) Selectivity profiling of *E. coli* DegP, *E. coli* DegS and human HtrA1 substrates. *Institute of Medical Immunology, Charité Berlin*. Diplomarbeit.
- Wu, H., Feng, W., Chen, J., Chan, L.N., Huang, S. und Zhang, M. (2007a) PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators. *Mol Cell*. 28: 886-898.
- Wu, J., Liu, W., Bemis, A., Wang, E., Qiu, Y., Morris, E.A. *et al.* (2007b) Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 56: 3675-3684.
- Wulfig, C. und Pluckthun, A. (1994) Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 12: 685-692.
- Xu, X.Z., Choudhury, A., Li, X. und Montell, C. (1998) Coordination of an array of signaling proteins through homo- and heteromeric interactions between PDZ domains and target proteins. *J Cell Biol*. 142: 545-555.
- Yamashita, E., Zhaltina, M.V., Zakharov, S.D., Sharma, O. und Cramer, W.A. (2008) Crystal structures of the OmpF porin: function in a colicin translocon. *EMBO J*. 27: 2171-2180.
- Yifrach, O. und Horovitz, A. (1995) Nested cooperativity in the ATPase activity of the oligomeric chaperonin GroEL. *Biochemistry*. 34: 5303-5308.
- Young, J.C., Agashe, V.R., Siegers, K. und Hartl, F.U. (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5: 781-791.
- Young, J.C. und Hartl, F.U. (2003) A stress sensor for the bacterial periplasm. *Cell*. 113: 1-2.
- Zabeau, M. und Roberts, R. (1979) The role of restriction endonucleases in molecular genetics. *Molecular Genetics Academic Press, ed. J. H. Taylor*.
- Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O. und Georgopoulos, C. (1991) The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Annu Rev Microbiol*. 45: 301-325.
- Zeth, K. (2004) Structural analysis of DegS, a stress sensor of the bacterial periplasm. *FEBS Lett*. 569: 351-358.
- Zhang, Y., Appleton, B.A., Wiesmann, C., Lau, T., Costa, M., Hannoush, R.N. *et al.* (2009) Inhibition of Wnt signaling by Dishevelled PDZ peptides. *Nat Chem Biol*. 5: 217-219.
- Zhang, Y., Appleton, B.A., Wu, P., Wiesmann, C. und Sidhu, S.S. (2007) Structural and functional analysis of the ligand specificity of the HtrA2/Omi PDZ domain. *Protein Sci*. 16: 1738-1750.
- Zumbrunn, J. und Trueb, B. (1996) Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Lett*. 398: 187-192.

7 Anhang

Tab. 7-1: Inkubation der EcoBib Peptidbibliothek mit DegP

Dargestellt sind alle an DegP bindenden Peptide des Screening der EcoBib. Die Signalintensitäten sind gemessen in Boehringer Light Units (BLU) mit einem LumiImager. Expositionszeit 1 min, Einstellung 208/720. Die Peptide wurden mit der Methode der invertierten Peptide, einer modifizierten SPOT Synthese, generiert.

Spot	BLU	C-Terminus	Name
43	48,266	ITTAGLKYTF	OMPP
195	42,674	RLFQSPFFL	TRKA
152	42,495	IARLAAELLV	AROM
121	42,213	LSQINQAKLA	YDHR
176	41,097	NWRVQAILYA	YJFN
278	40,476	DYFGSALLRV	YCDB
467	40,367	YVEFDMTFRF	PGAA
30	40,331	QVVATATFRF	FHUA
89	35,754	VERNLA VLTL	YBAV
339	35,386	RPEVTMLELV	YAEI
591	30,744	ANTTFQITYL	YFCV
315	29,434	RVKKGEFELL	BGLX
72	28,873	TVRPGSPARL	METR
27	28,632	EYTLSGSYTF	BTUB
324	27,885	ITTAGLKYTF	OMPT
508	26,518	ASILPVEWLL	YMDC
476	26,329	YVKEWRQQLA	YAGP
17	26,322	IVAVGMTYQF	PHOE
262	24,550	GNVTISVQYL	GLTF
62	23,791	VFMFSAGYRF	OMPW
59	23,734	LISTGITYKF	MIPA
49	23,635	GCLRAKLEII	FLGI
218	22,820	RYFMAVDYRF	CIRA
331	22,030	VYALINAEAF	KDPF
85	21,529	TNGSLIFKKI	FABF
52	20,228	VKFPAWSPYL	TOLB
541	19,605	DFYPSPLTRG	YECT
63	19,597	TWIAGVGYRF	OMPX
473	19,460	RELASLLQAL	WCAL
543	19,429	CHHSAFPVFL	YECR

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Ehrmann dafür, dass er mir diese Arbeit zur selbständigen Bearbeitung überlassen hat. Er hat mich engagiert und freundschaftlich betreut und unterstützt. Die zahlreichen Diskussionen mit ihm haben diese Arbeit immer gefördert.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Markus Kaiser und Patrick Hauske, Chemical-Genomic-Centre am Max-Planck Institut Dortmund, für die Synthese und Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Peptide bedanken.

Für die Synthese von Substraten möchte ich mich bei Dr. Tim Clausen und Dr. Tobias Krojer, Institut für Molekulare Pathologie (IMP) Wien, bedanken.

Prof. Albert Sickmann und Dr. René P. Zahedi, Institut für Proteomik am ISAS Dortmund, danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Außerdem danke ich Eike Wolter, AG Volkmer, Institut für Medizinische Immunologie an der Charité Berlin, für die Herstellung und das Screening der Peptidbibliothek.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch an alle Mitarbeiter meiner Arbeitsgruppe richten. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. Melisa Merdanovic und Dr. Michael Meltzer für die Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Schließlich danke ich meiner Familie für die tatkräftige Unterstützung. Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Ehemann Paul Mamant.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Nicolette Mamant, geb. Kucz
Diplom-Biologin
geboren am 12.05.1981 in Essen
verheiratet

Berufliche Erfahrungen

	Mitarbeit
seit 09/2005	Wissenschaftliche Mitarbeit im Rahmen der Promotion am Zentrum für Medizinische Biotechnologie (ZMB)/ Mikrobiologie II der Universität Duisburg-Essen
seit 01/2008	Assistenz der Geschäftsleitung des Zentrums für Medizinische Biotechnologie (ZMB) der Universität Duisburg-Essen
	Praktika und studentische Tätigkeiten
06/2000-10/2000	Janssen-Cilag, Neuss, Präklinische Forschung
07/2004-01/2005	Studentische Hilfskraft, Forschungszentrum Jülich, Institut für Molekulare Enzymtechnologie

Hochschulausbildung

	Biologie
seit 09/2005	Promotion am Zentrum für Medizinische Biotechnologie (ZMB) der Universität Duisburg-Essen Prof. Michael Ehrmann, Mikrobiologie II Titel: „Charakterisierung des Aktivierungsmechanismus der HtrA-Protease DegP von <i>E. coli</i> “;
10/2000-05/2005	Studium der Biologie, Ruhr-Universität Bochum Diplom, Abschluss „mit Auszeichnung“ (1,0)
04/2004-03/2005	Diplomarbeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich Titel: „Erzeugung eines <i>nif</i> -Promotor basierten Expressionssystems in <i>Rhodobacter capsulatus</i> “
	Wirtschaftswissenschaft
Seit 09/2008	Studium der Wirtschaftswissenschaft Fernuniversität in Hagen, Bachelor
04/2006-09/2008	Studium der Wirtschaftswissenschaft, Fernuniversität in Hagen, Vordiplom mit der Gesamtnote 2,7

Schulbildung

1991-2000	Mädchengymnasium Borbeck, Essen Allgemeine Hochschulreife, Note 1,7
1987-1991	Grundschule Höltingschule, Essen

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Charakterisierung des Aktivierungsmechanismus der HtrA-Protease DegP von *E. coli*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Nicolette Mamant befürworte.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Angaben zur Prüfung

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie II der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Ehrmann
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Siebers
3. Gutachter: Prof. Dr. H. de Groot

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. P. Bayer

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2009